

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ALLEN CAROLINA DOS SANTOS COSTA**

**APLICAÇÃO DE LIPASES COMERCIAIS E NÃO-COMERCIAIS EM REAÇÕES DE
RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS QUIRAIS**

CURITIBA, 2014

ALLEN CAROLINA DOS SANTOS COSTA

**APLICAÇÃO DE LIPASES COMERCIAIS E NÃO-COMERCIAIS EM REAÇÕES DE
RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS QUIRAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química, Área de Concentração: Química Orgânica.
Orientador: Prof. Dr. Leandro Piovan.
Co-orientadora: Prof. Dra. Nadia Krieger.

CURITIBA, 2014

Costa, Allen Carolina dos Santos

Aplicação de lipases comerciais e não-comerciais em reações de resolução cinética de álcoois secundários quirais / Allen Carolina dos Santos Costa. – Curitiba, 2014.

64 f. : il.; tabs., grafs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Leandro Piovan

Coorientadora: Nadia Krieger

Bibliografia: p.59-64

1. Enzimas. 2. Genômica. 3. Biotecnologia. I. Piovan, Leandro. II. Krieger, Nadia. III. Título.

CDD 660.6

TERMO DE APROVAÇÃO

APLICAÇÃO DE LIPASES COMERCIAIS E NÃO COMERCIAIS DE EM REAÇÕES DE RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ALCOÓIS SECUNDÁRIOS QUIRAIS

por

ALLEN CAROLINA DOS SANTOS COSTA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof. Dr. Leandro Piovan
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Rogério Aparecido Gariani
Dep. de Química – UDESC



Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 29 de agosto de 2014.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Prof. Dr. Leandro Piovan e à Prof. Dra. Nadia Krieger pela valiosa oportunidade de aprendizado.

Ao Prof. Dr. Rogério Aparecido Gariani e Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira pela participação na banca avaliadora.

À Prof. Dra. Ana Luíza Lacava Lordello e Prof. Dra. Maria Rita Sierakowski pela participação na banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Alfredo Ricardo Marques de Oliveira pelas valiosas contribuições ao longo de todo o trabalho.

Ao grupo do Prof. Paulo Zarbin pela infra-estrutura do seu laboratório em algumas análises.

Ao Professor Emanuel Maltempi de Souza.

Ao NPDEAS – Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energia Sustentável da UFPR, pela infra-estrutura do laboratório em algumas análises.

Ao Grupo de Fixação de Nitrogênio, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

Ao Departamento de Química da UFPR.

Ao Programa de pós-graduação em química da UFPR, ao atual coordenador Professor Ronílson, aos secretários Marcelino e Emilene.

Ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro.

À minha família.

À família Bindewald.

Ao meu namorado.

Aos meus amigos feitos aqui em Curitiba e aos que ficaram na minha cidade.

Aos meus amigos do Laboratório de Tecnologia Enzimática – feitos através das tortuguitas.

Aos meus amigos do Laboratório de Síntese Química e Enzimática.

À Talita Cadorin Fraiz e Felipe Ramiro.

À Dona Maria e sua família pela acolhida, e as Marias (Vanda, Edi, Pri, Jacque, Aline, Vanessa, Gislaine, Mikaela e Fernanda) pelo convívio no lar que fez com que a distância e a saudade de casa fosse amena.

Ao pessoal do TECPAR.

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 - SÍNTESE DOS COMPOSTOS 1, 2 E 3 A PARTIR DA REDUÇÃO DA ACETOFENONA CORRESPONDENTE COM NaBH_4	41
ESQUEMA 2 - SÍNTESE DO COMPOSTO 4 VIA REAÇÃO DE GRIGNARD	41
ESQUEMA 3 - SÍNTESE DOS ÁLCOOIS 5 E 6 VIA REAÇÃO DE GRIGNARD	42
ESQUEMA 4 - SÍNTESE DOS ÉSTERES 1a-7a DE INTERESSE	42

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICEROL MEDIADA PELA LIPASE.....	14
FIGURA 2 - MODELO ESTRUTURAL De α/β HIDROLASES.....	14
FIGURA 3 - MODELO POR HOMOLOGIA DA LIPASE LipC12 COM A TAMPA HIDROFÓBICA(LID) REPRESENTADA NA COR CINZA.FONTE: GLOGAUER (2011). Em a e c modelos de fitas e superfície com a lid fechada. Em b e d modelos de fitas e superfície com a lid aberta. A esfera a esquerda ilustra o íon cálcio na sua possível localização na estrutura.....	15
FIGURA 4 - MECANISMO DE AÇÃO DE UMA LIPASE FONTE:	17
FIGURA 5 –DIFERENTES NUCLEÓFILOS E OS PRODUTOS CORRESPONDENTES GERADOS	18
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE DO SISTEMA (ΔG) EM FUNÇÃO DA REAÇÃO CATALISADA PELA ENZIMA. ONDE: E REPRESENTA A ENZIMA, A E B OS DOIS ENANTIÔMEROS DA MISTURA A SER RESOLVIDA, P E Q OS DOIS POSSÍVEIS PRODUTOS E $\Delta\Delta G^\ddagger$ É A ENERGIA DIFERENCIAL DE ATIVAÇÃO ENTRE OS ENANTIÔMEROS.	20
FIGURA 7- REQUISITOS ESTÉRICOS DAS LIPASES DE <i>C. antarctica</i> B, <i>C.rugosa</i> E <i>B. cepacia</i> 1.....	21
FIGURA 8– SÍNTESE DO FÁRMACO CLORIDRATO DE FLUOXETINA, DE NOME COMERCIAL PROZAC®.....	24
FIGURA 9–a) MODELO DE SÍTIO ATIVO DERIVADO DA REGRA DE KAZLAUSKAS; b) ENANTIÔMEROS DE ÁLCOOL SECUNDÁRIO ESTERICAMENTE IMPEDIDO, ONDE: (L) É O GRUPO GRANDE E (M) O GRUPO MÉDIO; c) A DIFERENÇA DE COMPLEMENTARIDADE ESTÉRICA RESULTA EM DIFERENÇAS DE VELOCIDADES: (I) ENANTIÔMERO DE REAÇÃO MAIS RÁPIDA E (II) ENANTIÔMERO DE REAÇÃO MAIS LENTA NO MODELO SÍTIO ATIVO PARA LIPASES DERIVADO DA REGRA DE KAZLAUSKAS E COL. (1991) ³²	25
FIGURA 10- EXEMPLO DE REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO ESTEREOSSELETIVAS DE CETONAS ESTERICAMENTE IMPEDIDAS ³³	26
FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS 1 E 1a EMPREGADOS COMO PADRÕES CROMATOGRÁFICOS.	38

FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO COMPOSTO 1 MEDIADA POR CAL B	38
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO COMPOSTO 1a MEDIADA PELA LIPASE CAL B	38
FIGURA 14- ÁLCOOIS INTERESSE SINTETIZADOS.....	40
FIGURA 15 - ÉSTERES DERIVADOS DOS ÁLCOOIS DE INTERESSE.....	40

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1– CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS.....	13
TABELA 2 - ATIVIDADE DE HIDRÓLISE	43
TABELA 3 – REAÇÕES DE RCE DOS COMPOSTOS 1-3 MEDIADAS POR DIFERENTES LIPASES.....	45
TABELA 4 - REAÇÕES DE RCE DOS COMPOSTOS 1a-3a MEDIADAS POR DIFERENTES LIPASES.....	47
TABELA 5 - REAÇÕES DE RCE DOS COMPOSTOS 4-7 MEDIADAS POR DIFERENTES LIPASES.....	50
TABELA 6 – REAÇÕES DE RCE DOS COMPOSTOS 4a-7a MEDIADAS POR DIFERENTES LIPASES.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	ENZIMAS	13
2.2	LIPASES	14
2.2.1	Definição e características.....	14
2.2.2	Mecanismo de reação	16
2.2.3	Reconhecimento quiral por lipases e resolução cinética	18
2.2.4	Fontes de lipases.....	22
2.3	ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS ENANTIOMERICAMENTE PUROS	23
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	SÍNTESE QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INTERESSE	28
4.1.1	Síntese de álcoois 1 , 2 e 3 via redução química com NaBH ₄	29
4.1.2	Síntese do álcool 4	30
4.1.3	Síntese de álcoois 5 e 6	31
4.1.4	Purificação do álcool 7	32
4.1.5	Síntese dos ésteres de interesse: 1a , 2a , 3a , 4a , 5a , 6a e 7a	32
4.2	OBTENÇÃO DAS ENZIMAS PARA AVALIAÇÃO COMO BIOCATALISADORES.....	34
4.1	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE	35
4.2	AVALIAÇÃO DA ENANTIOSSELETIVIDADE DAS LIPASES: CAL B, C. <i>rugosa</i> , <i>B. cepacia</i> , LipC6G9 e LipC12.....	36

4.2.1	Reação de transesterificação dos compostos 1 a 7 catalisada pelas lipases CAL B, <i>C. rugosa</i> , <i>B. cepacia</i> , LipC6G9 e LipC12.	36
4.2.2	Reação de hidrólise dos compostos 1a a 7a catalisada pelas lipases CAL B, <i>C. rugosa</i> , <i>B. cepacia</i> , LipC6G9 e LipC12.	36
4.2.3	Resolução cromatográfica dos álcoois e ésteres	36
4.2.4	Determinação das configurações absolutas dos compostos nas reações de RCE.....	37
4.2.5	Determinação da conversão e excessos enantioméricos das reações de RCE.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INTERESSE	40
5.1.1	Síntese dos álcoois 1-7	41
5.1.2	Síntese dos ésteres de interesse via acetilação química dos álcoois aromáticos.....	42
5.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE	43
5.3	RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE DOS COMPOSTOS 1-7, E SEUS ÉSTERES CORRESPONDENTES.....	44
5.3.1	Resolução cinética enzimática dos compostos 1-3 e 1a-3a	44
5.3.2	Resolução cinética dos compostos 4-7 e 4a-7a	49
6	CONCLUSÕES	54
7	REFERÊNCIAS.....	55

RESUMO

As técnicas convencionais de obtenção de enzimas, baseadas no isolamento de microrganismo, têm a etapa de cultivo em meios artificiais como a principal limitação, e, portanto, diferentes abordagens biotecnológicas têm sido usadas para a obtenção de novas enzimas de interesse. A metagenômica é uma das técnicas empregadas como alternativa ao cultivo de microrganismo. Esta técnica consiste na extração direta de fragmentos de DNA a partir do ambiente e subsequente sequenciamento, análise e a superexpressão num microrganismo hospedeiro cultivável em laboratório. Neste trabalho, avaliou-se duas lipases obtidas a partir de uma biblioteca metagenômica, LipC6G9 e LipC12, e uma lipase obtida do microrganismo *Burkholderia cepacia*, em reações de resolução cinética enzimática de álcoois secundários racêmicos e seus respectivos ésteres. A maioria das reações mediadas pelas enzimas citadas mostraram alta razão enantiomérica ($E > 200$), e excessos enantioméricos dos produtos elevados ($\geq 99\%$). Os resultados promissores demonstram que as enzimas não-comerciais avaliadas podem ser utilizadas na biotransformação de compostos orgânicos, e mesmo não sendo enzimas modificadas geneticamente, as lipases inéditas obtiveram conversão e seletividade comparáveis as das enzimas comerciais, mesmo sem otimização de parâmetros reacionais.

Palavras chave: lipases, álcoois secundários, resolução cinética enzimática, metagenômica.

ABSTRACT

Conventional techniques of isolating enzymes have limitations of cultivation, and different approaches must be used for obtaining new enzymes of biotechnological interest. Metagenomic technique can be used like alternative method of isolate enzymes and consists in the direct extraction of DNA fragments from environment and subsequent sequencing, analysis and overexpression into a host microorganism culturable in the laboratory. At this study, it was evaluated two new lipases from a metagenomic library, LipC6G9 and LipC12, and a lipase obtained from the microorganism *Burkholderia cepacia*, for enzymatic kinetic resolution of racemic secondary alcohols and respective ester. For most evaluated reactions mediated by enzymes showed high enantiomeric ratio ($E > 200$), and enantiomeric excess of products ($> 99\%$), however LipC6G9 for transesterification reactions requires a shorter time so as LipC12, and it was observed that the presence of a substituent on the aromatic ring can influence the selectivity enzyme. Despite of require a long time of reactions, the enzymes evaluated demonstrated high potential for kinetic resolution of secondary alcohols even without optimized parameters of reactions.

Keywords: lipases, secondary alcohols, enzymatic kinetic resolution, metagenomic.

1 INTRODUÇÃO

As Lipases são enzimas que têm como função natural a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, liberando di- ou monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Fora de seu ambiente natural, as lipases catalisam uma série de reações, dependendo dos reagentes e do solvente empregados, apresentando propriedades de regio- e enantiosseletividade frente ao substrato, são estáveis em meios orgânicos e não dependem de cofatores.^{1, 2, 3}

Essas características justificam a grande aplicação de lipases como biocatalisadores em diferentes ramos industriais, desde a indústria de detergentes, de cosméticos, alimentos (síntese de aromas, modificação de óleos e gorduras, flavorizantes), fármacos (obtenção de intermediários de síntese ou compostos quirais), biocombustíveis (síntese de ésteres do biodiesel) e até no tratamento de efluentes.^{1,2,3}

Devido à essa versatilidade têm-se buscado cada vez mais obter novas e melhores lipases capazes de se adaptarem às condições utilizadas em biocatálise, como meios reacionais distintos, como por exemplo, solventes orgânicos.

Tradicionalmente, a obtenção de novas enzimas tem sido realizada através do isolamento e cultivo de microrganismos, porém, essa técnica apresenta limitações, pois apenas 1% dos microrganismos existentes na biodiversidade são cultiváveis, por isso, novas abordagens vêm sendo utilizadas com esse objetivo.

Estratégias baseadas em biologia molecular e engenharia de proteínas têm sido empregadas com sucesso para encontrar ou desenvolver o biocatalisador desejado. Dentre essas abordagens, a triagem em bibliotecas metagenômicas é uma alternativa eficiente para encontrar novos biocatalisadores. A metagenômica envolve a coleta e análise de genomas de todos os microrganismos presentes em um determinado ambiente. A partir disso, pode se ter acesso a uma riqueza de informações sobre novos genes e moléculas com aplicações biotecnológicas.

Muitas lipases obtidas por metagenômica já foram descritas, mas ainda não foram relatadas aplicações em reações de síntese orgânica consideradas mais elaboradas. Neste trabalho, duas lipases inéditas obtidas de uma biblioteca metagenômica foram avaliadas em reações de resolução cinética de álcoois secundários.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENZIMAS

Enzimas são proteínas que tem como função específica acelerar reações químicas que ocorrem nos organismos, podendo ser denominadas catalisadores ou biocatalisadores. Devido ao grande número de enzimas existentes e de reações catalisadas por elas, essas são classificadas e codificadas pela União internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) de acordo com a reação em que mediam *in natura*. A nomenclatura utiliza a abreviação E.C. (*Enzyme Commission*) seguida de até quatro dígitos referentes à classe e subclasses que a enzima pertence, e um nome sistemático que identifica a reação catalisada. As enzimas são separadas em seis grandes classes (TABELA 1) de acordo com a natureza da reação química que catalisam, e cada grande classe com sub-classes.⁴

TABELA 1– CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

CLASSE DE ENZIMAS	ALGUMAS SUBCLASSES	REAÇÕES CATALISADAS
Oxidoredutases E.C. 1	Hydrogenases, oxidases, Peroxidases	Oxidação e redução: oxidação das ligações C-H, C-C, C=C, C=O
Transferases E.C. 2	Transaldolases, transacetolase	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acila, açúcar, fosforila ou metila
Hidrolases E.C. 3	Esterases, lipases, peptidases, celulases, amilases	Hidrólise e síntese de ésteres, amidas, epóxidos, nitrilas e anidridos e hidrólise de carboidratos
Liasas E.C. 4	Descarboxilases, cetoacidoliasas	Adição eliminação de pequenas moléculas a ligações C=C, C=N, C=O
Isomerases E.C. 5	Racemases, epimerases, mutases	Isomerizações tais como racemização e epimerização
Ligases E.C. 6	DNA-ligases, NAD ⁺ -sintetases	Síntese e clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C

FONTE: E. C. (ENZYME COMMISSION) - IUBMB (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY)

Como neste trabalho as enzimas avaliadas foram as lipases, uma maior atenção será dada a esta sub-classe das hidrolases. As lipases são as enzimas hidrolíticas mais utilizadas em biocatálise por não dependerem de cofatores. Elas são classificadas pela comissão de nomeação de enzimas, com o número E.C. 3.1.1.3, que indica que elas pertencem a grande classe de hidrolases (E.C. 3) que naturalmente atuam em ligações éster (E.C. 3.1), mais especificamente de éster

carboxílicos (E.C. 3.1.1) de triacilgliceróis (E.C. 3.1.1.3), ou seja, têm como função natural a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol como demonstrado na FIGURA 1.⁵

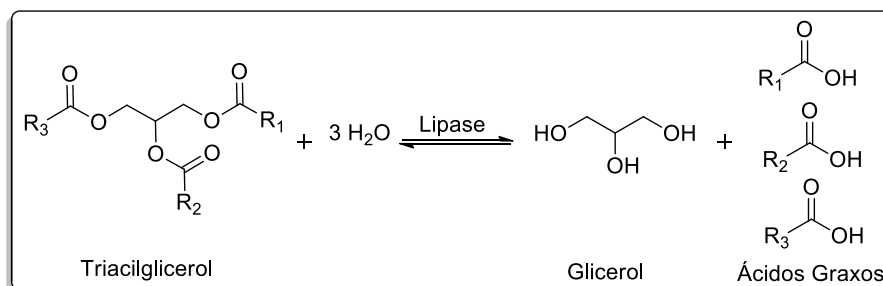


FIGURA 1 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE (DIRETA) OU DE SÍNTESE (INVERSA) DE TRIACILGLICEROL MEDIADA POR UMA LIPASE GENÉRICA.

2.2 LIPASES

2.2.1 Definição e características

Do ponto de vista estrutural as lipases apresentam massa molar entre 19 e 60 kDa, com uma estrutura terciária comum, uma dobra padrão do tipo α/β hidrolase. Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central formado por fitas β paralelas (setas), rodeado por porções α -hélice (bastões). As fitas β têm orientação para a esquerda, sendo que ângulo diedro entre a primeira e a última fita é de aproximadamente 90° . O núcleo central das α/β hidrolases é composto por até oito fitas β paralelas rodeadas por até seis α -hélices (FIGURA 2).^{6,7}

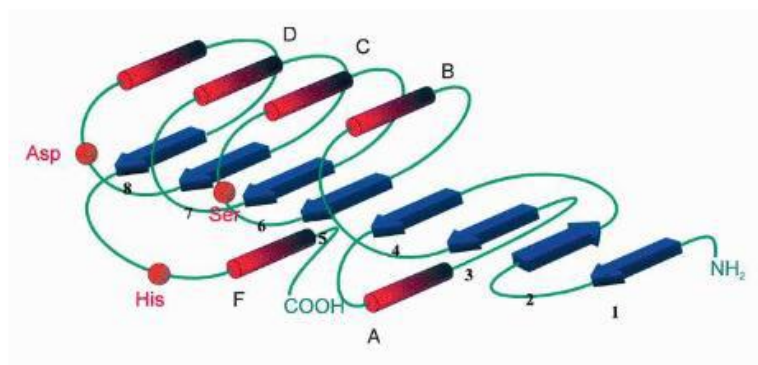


FIGURA 2 - MODELO ESTRUTURAL De α/β HIDROLASES

As α -hélices são representadas pelos cilindros vermelhos e as folhas β pelas setas azuis. Os círculos sólidos em vermelho representam as posições topológicas dos resíduos que compõem o sítio ativo.

Fonte: BORNSCHEUER (2002).

A maioria das lipases apresenta uma α -hélice curta que recobre o sítio catalítico, chamada de “tampa hidrofóbica” ou “*lid*”. Em meio aquoso, a tampa hidrofóbica cobre o sítio catalítico e a enzima se encontra na sua forma “fechada” ou não-cataliticamente ativa. Ao interagir com substratos hidrofóbicos em solução aquosa, as lipases sofrem mudanças conformacionais na estrutura, deslocando a tampa hidrofóbica, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima tornando-a cataliticamente ativa. Essa mudança conformacional é conhecida como “ativação interfacial”, e também foi observada em lipases que não possuem a estrutura da tampa hidrofóbica.^{11,8,10}

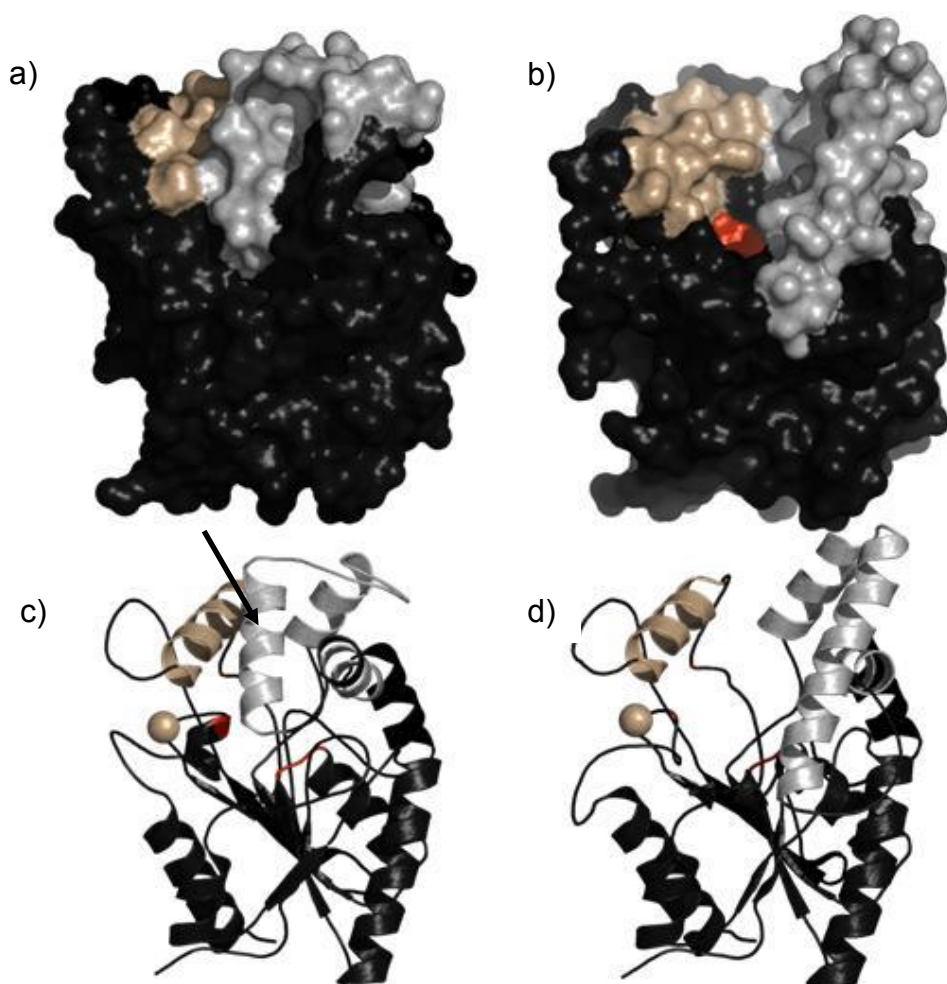


FIGURA 3 - MODELO POR HOMOLOGIA DA LIPASE LipC12 COM A TAMPA HIDROFÓBICA(LID) REPRESENTADA NA COR CINZA.FONTE: GLOGAUER (2011). Em a e c modelos de fitas e superfície com a lid fechada. Em b e d modelos de fitas e superfície com a lid aberta. A esfera a esquerda ilustra o íon cálcio na sua possível localização na estrutura.

A ativação interfacial era uma característica muito utilizada para a diferenciação entre lipases e esterases.⁹ As esterases (E.C. 3.1.1.1) são enzimas que não apresentam a ativação interfacial e exercem sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água, mais especificamente ésteres, ao contrário das lipases que seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados. Entretanto, foi observado que existem lipases como as de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B que possuem uma tampa hidrofóbica cobrindo seus sítios ativos, mas não apresentam a ativação interfacial, e então a presença de “tampa hidrofóbica” e ativação interfacial deixou de ser uma característica que diferencia as lipases de esterases.^{6,10}

Devido a isso, as lipases têm sido definidas como enzimas que hidrolisam triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono, enquanto que as esterases são enzimas que hidrolisam acilgliceróis compostos de ácidos graxos de cadeia curta, menos de dez átomos de carbono. No entanto, a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos das esterases, os triacilgliceróis de cadeia curta e média, enquanto que as esterases não hidrolisam triacilgliceróis de cadeia longa.¹⁰

Além da atividade de hidrólise, as lipases catalisam uma série de reações dependendo dos reagentes de partida empregados e do solvente utilizado, ou seja, se a quantidade de água do sistema é suficientemente baixa (meio aquo-restrito) há um deslocamento do equilíbrio da reação no sentido os reagentes. Essas reações geralmente acontecem com elevada regio- e/ou enantiosseletividade.¹¹

2.2.2 Mecanismo de reação

A catálise propriamente dita acontece no sítio ativo das lipases, que é formado por uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácidos: serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. Esse sítio catalítico está localizado na posição C-terminal da fita $\beta 5$ e faz parte de um pentapeptídeo altamente conservado: Gly-His-Ser-His-Gly.¹⁰

O mecanismo de ação de uma lipase (

FIGURA 4) é muito semelhante ao observado na hidrólise química alcalina, e é o mesmo modelo proposto para a quimotripsina, uma serino protease, devido à semelhança estrutural entre o sítio catalítico de lipases e proteases.^{12,13,14}

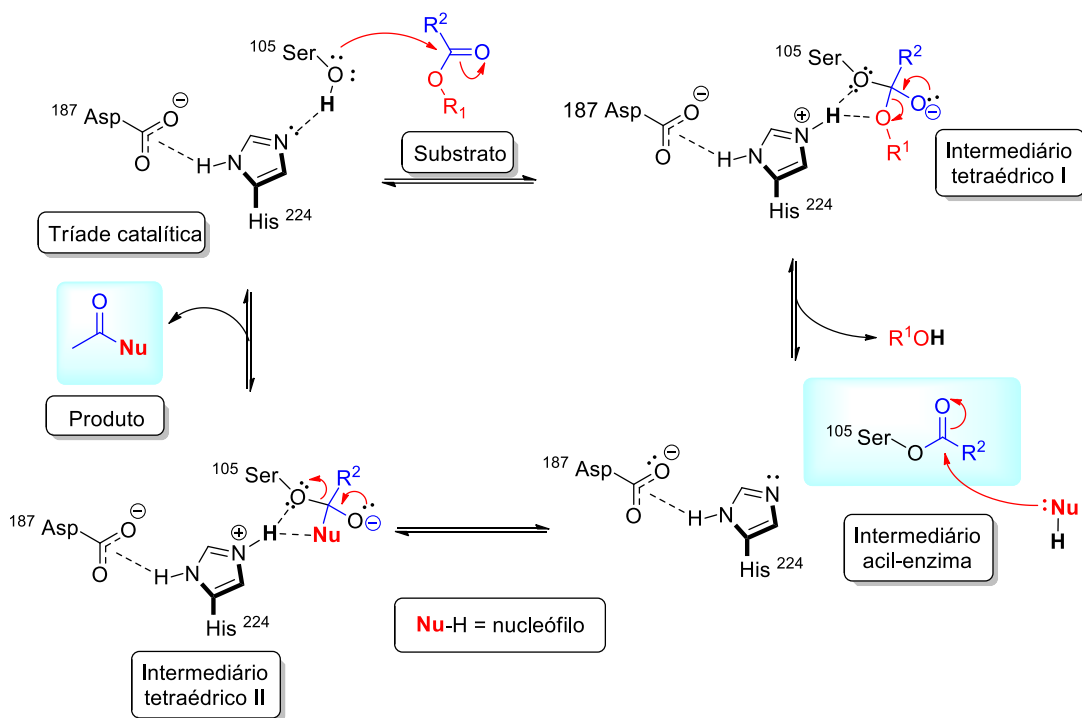


FIGURA 4 – MECANISMO DE AÇÃO DE UMA LIPASE

O arranjo espacial dos três resíduos de aminoácidos (serina, histidina e aspartato) faz com que a histidina interaja com o hidrogênio da hidroxila da serina por ligação de hidrogênio, e o grupo carboxilato do ácido aspártico atue de modo a estabilizar a histidina. Esta interação entre os resíduos de aspartato, histidina e serina, diminui o pKa da serina tornando-a mais nucleofílica. A primeira etapa é um ataque nucleofílico à carbonila do grupo éster do substrato, que pode ser um triacilglicerol, pelo resíduo de serina formando um intermediário tetraédrico. Com a convergência dos elétrons do oxigênio formado para o carbono carbonílico e a transferência do próton situado na histidina ocorre a liberação do primeiro produto, um álcool, de forma que a enzima e o substrato ficam ligados covalentemente, formando o intermediário acil-enzima. Na sequência, um nucleófilo (Nu-H), água no caso da hidrólise, ataca o intermediário acil-enzima, regenerando a enzima e liberando um ácido carboxílico como segundo produto.^{1,12,13}

Além da água, outras espécies podem ser empregadas como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas, como exemplificado na FIGURA 5, desta forma, as lipases podem mediar reações como: transesterificação, peroxidação, aminólises e hidrazinólise em solventes orgânicos, apresentando elevada seletividade e propiciando a utilização destas enzimas em diferentes aplicações.^{2,15}

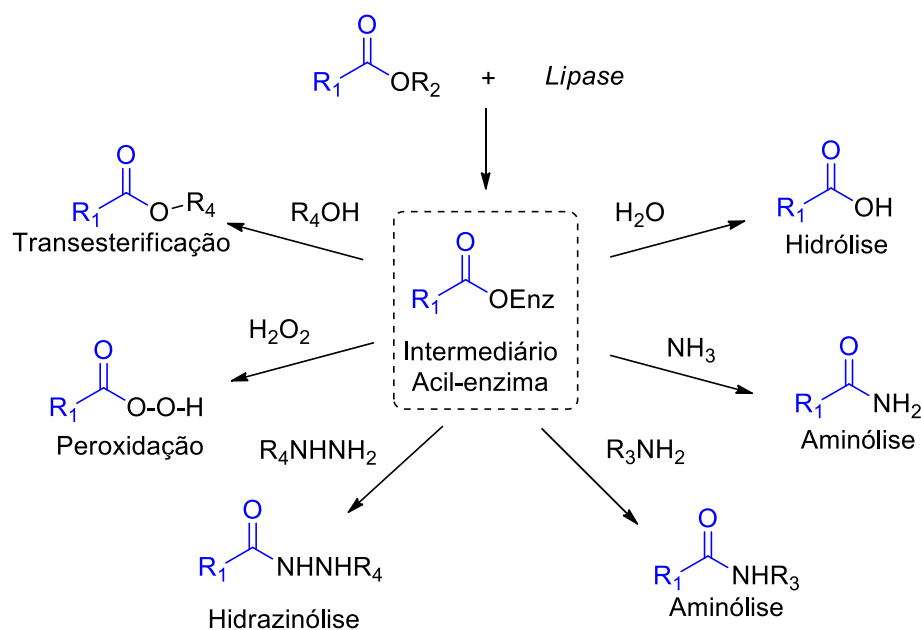


FIGURA 5 –DIFERENTES NUCLEÓFILOS E OS PRODUTOS CORRESPONDENTES GERADOS

2.2.3 Reconhecimento quiral por lipases e resolução cinética

Em um contexto de síntese assimétrica, mais especificamente o de catálise assimétrica, as reações mediadas por enzimas promovem uma série de transformações em substratos pró-quirais, tais como: reduções de carbonilas (na presença dos cofatores NADH ou NADPH, que são os agentes redutores), oxidações de álcoois e de anéis aromáticos e hidrólise de ésteres.

Em geral, as enzimas, catalisam reações com uma eficiência extraordinária, e devido à sua alta seletividade, proporcionam reações com baixa formação de subprodutos, sendo uma alternativa econômica e ambientalmente viável para os catalisadores químicos convencionais, uma vez que por serem constituídas de aminoácidos as enzimas são biodegradáveis e quirais, apresentando quimio-, regio e estereosseletividade.^{16,17}

Esses fenômenos de diferenciação enantiomérica enzimática acontecem devido às várias interações diastereoisoméricas que ocorrem entre os enantiômeros e o sítio ativo da enzima. A enantiosseletividade depende em grande parte das propriedades químicas e da estrutura do substrato, da origem da enzima e das condições experimentais utilizadas na biocatálise.¹⁸

Apesar de que em um racemato, os enantiômeros atuem como substratos adequados para uma lipase, na maioria das vezes elas são capazes de discriminá-los, bem como os grupos de moléculas pró-quirais enantiotrópicas.¹⁹

Em razão desse reconhecimento quiral, as lipases podem ser empregadas na resolução cinética de racematos, que pode ser explicado da seguinte forma (FIGURA 6): tal como em todas as outras reações catalíticas, um catalisador, nesse caso uma enzima (E), acelera a reação diminuindo a barreira energética da reação de conversão do substrato (A e B) no produto (P e Q). Este tipo de reação baseia-se nas interações diferenciais da enzima com dois estereoisômeros, o que leva a distintas velocidades de transformação de cada um deles. Devido ao ambiente quiral do sítio ativo da enzima, na presença do substrato é formado um complexo diastereoisomérico com cada enantiômero, esses dois complexos diastereoisoméricos possuem diferentes valores de energia livre (ΔG), nos respectivos estados de transição ($[EA]^\ddagger$ e $[EB]^\ddagger$). Assim, se a interação de um estereoisômero é mais favorável que a de seu antípoda, a velocidade de transformação deste enantiômeros é maior e ele é transformado preferencialmente, enquanto o outro estereoisômero permanece no meio sem reagir²⁰.

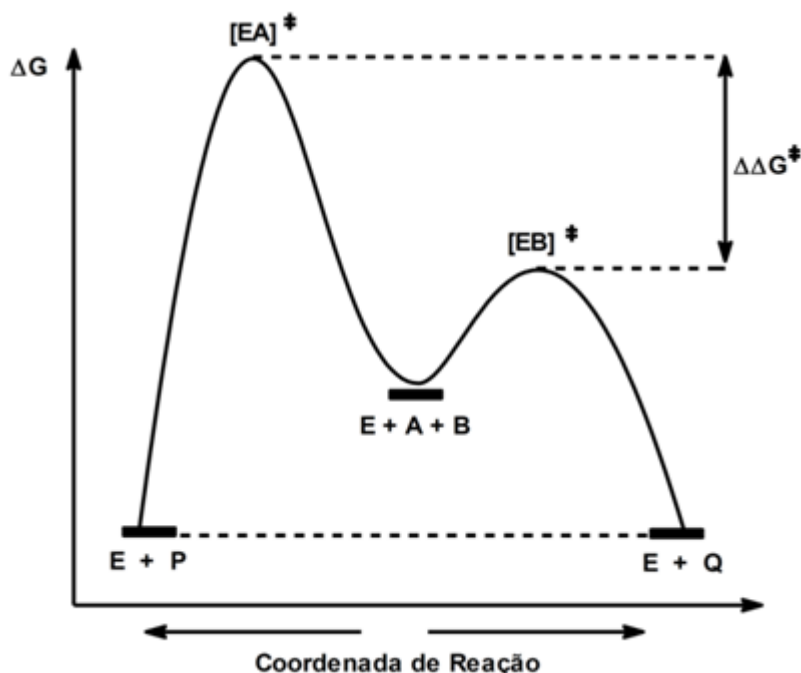


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE DO SISTEMA (ΔG) EM FUNÇÃO DA REAÇÃO CATALISADA PELA ENZIMA. ONDE: E REPRESENTA A ENZIMA, A E B OS DOIS ENANTIÔMEROS DA MISTURA A SER RESOLVIDA, P E Q OS DOIS POSSÍVEIS PRODUTOS E $\Delta\Delta G^\ddagger$ É A ENERGIA DIFERENCIAL DE ATIVAÇÃO ENTRE OS ENANTIÔMEROS.

Os avanços na engenharia de proteínas e cristalografia de raios X permitiram estudar e entender o mecanismo revelado durante a interação da lipase com o substrato em seu local quiral.¹⁹ Para casos em que não há estudos de raio X do seu sítio ativo e nem da sequência de aminoácidos da enzima para comparação com sítios ativos conhecidos, modelos baseados em vários substratos sintéticos foram desenvolvidos para prever a preferência enantiomérica de lipases para um substrato quiral.

Via de regra, as lipases mais utilizadas em síntese orgânica possuem modelos, e podem ser caracterizadas de acordo com o tamanho de seus substratos. Para este trabalho, a fim de comparação com as lipases inéditas, foram escolhidas duas enzimas comerciais com modelos de substratos conhecidos: a lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) e a lipase de *Candida rugosa* (sinônimo de *Candida cylindracea*) disponíveis no LaSQuE (Laboratório de Síntese Química e Enzimática).

A lipase CAL B é obtida a partir da levedura de *C. antarctica basidiomycetous* isolada na Antártica, com o objetivo de encontrar enzimas com propriedades extremas para ser utilizados em formulações de detergentes. Como outros, o organismo produz duas isoenzimas A e B, que diferem de modo significativo: enquanto lipase A (CAL A)

é dependente de Ca^{2+} e mais termoestável, a componente B é menos termotolerante, mas não depende de Ca^{2+} . A CAL B é muito versátil, ativa sobre uma ampla gama de ésteres, e outros substratos não naturais, inclusive que seguem a regra de Kazlauskas, em diversos tipos de solventes¹.

A lipase de *C. rugosa* possui várias formas de comercialização que contém até 16% de proteína e diferem em sua atividade, mas em seletividade são muito semelhantes. Esta lipase tem sido freqüentemente utilizada para a resolução de ésteres de álcoois secundários e, em menor grau, para a resolução de carboxilatos α -substituídos. Como a lipase de *C. rugosa* é capaz de acomodar ésteres relativamente volumosos em seu sítio ativo, é a lipase de escolha para a hidrólise seletiva de ésteres de álcoois secundários cíclicos.¹

A FIGURA 7 também mostra o requisito estérico da lipase de *B. cepacia* já comercializada (sinônimo de *Pseudomonas cepacia*), que possui estrutura determinada por raio-X, e possui um sítio ativo mais estreito do que a lipase de *C. rugosa* e da lipase de *C. antarctica* B, uma vez que é incapaz de acomodar substratos volumosos. Como a maioria das lipases microbianas, e comercialmente disponíveis, possui uma preferência estereoquímica para a hidrólise dos ésteres de álcoois secundários, mas a seletividade entre as diferentes formas comercializadas e cepas podem variar em certa medida.¹ De forma que a lipase de *B. cepacia* LTEB 11, imobilizada em suporte hidrofóbico Accurel MP 1000®, utilizada neste trabalho, pode ter uma seletividade um pouco diferente da comercializada em reações de síntese orgânica mais elaboradas.

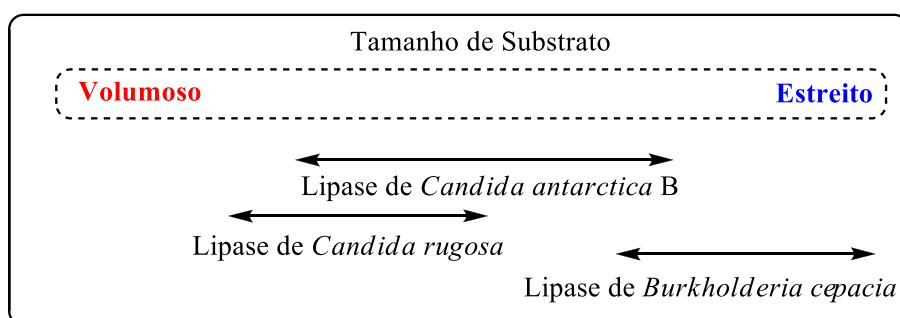


FIGURA 7- REQUISITOS ESTÉRICOS DAS LIPASES DE *C. antarctica* B, *C. rugosa* E *B. cepacia*¹.

2.2.4 Fontes de lipases

As lipases podem ser obtidas a partir de plantas, animais e microrganismos⁹. As lipases microbianas são as mais utilizadas devido a facilidade de manipulação genética e pela facilidade de produção devido ao rápido crescimento dos microrganismos. A produção de enzimas por via microbiana também permite fácil controle das condições de cultivo e pode ser realizada em escala industrial com custos relativamente baixos, pois geralmente as lipases bacterianas são extracelulares e produzidas por fermentação submersa.^{10;21}

As lipases de diferentes origens apresentam diferentes características de especificidade, e mesmo entre lipases microbianas de diferentes cepas existem fatores como: diferentes valores de pH (3 - 11) e temperatura (30 – 60 °C) que possuem maior atividade.²²

Apesar disso, a existência de enzimas conhecidas com propriedades requeridas em um determinado processo industrial é sempre limitada nesse sentido, e a procura por novos microrganismos produtores de lipases que superem essas condições é constante.²³

Geralmente, a obtenção de novas enzimas é realizada através do isolamento e cultivo de microrganismos, porém, essa técnica apresenta limitações, pois estima-se que apenas 1% dos microrganismos existentes sejam cultiváveis. Assim o desenvolvimento de novas e melhoradas técnicas de prospecção de enzimas lipases através de abordagens moleculares, como evolução dirigida e exploração de comunidades naturais pela abordagem metagenômica estão sendo empregadas.²²

2.2.4.1 Metagenômica

O termo metagenômica, cunhado por Jo Handelsman, é “a aplicação de técnicas de genômica moderna para o estudo de comunidades de microrganismos diretamente em seus ambientes naturais, sem a necessidade de isolamento e cultivo em laboratório das espécies individuais”.²⁴

A técnica de metagenômica consiste na extração dos fragmentos de DNA de determinado ambiente e posterior seqüenciamento e análise; em seguida, por técnicas de engenharia genética, os fragmentos de DNA extraídos são selecionados

e unidos a outros fragmentos de DNA, denominados vetores de clonagem, formando uma molécula de DNA circular, com capacidade independente de replicação, denominada DNA recombinante; e finalmente, essas moléculas de DNA são inseridas em uma bactéria hospedeira cultivável em laboratório, originando uma coleção de clones denominada biblioteca metagenômica. Através de técnicas de biologia molecular, os fragmentos de DNA extraídos são selecionados e unidos a vetores de clonagem. Os clones são submetidos à etapa de triagem para a propriedade desejada, que pode ser uma atividade enzimática ou produção de antibióticos e biosurfactantes.^{24; 25}

Lipases microbianas já foram obtidas a partir de prospecção metagenômica de diferentes ambientes, como por exemplo a duas lipases termoestáveis a partir de amostras de solo do Jardim Botânico da cidade de Hamburgo (Alemanha),²⁶ a partir de sedimentos de maré na Coreia do Sul,²⁷ de solo da região do Cerrado brasileiro,²⁸ mas nenhuma foi avaliada em reações de síntese orgânica mais elaboradas.

2.3 ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS ENANTIOMERICAMENTE PUROS

Os álcoois formam uma classe de compostos orgânicos amplamente utilizada em síntese orgânica, e são opção de racematos para o estudo de resolução cinética por lipases. Os álcoois são empregados principalmente, para a síntese de drogas quirais ou como intermediários de síntese e fragrâncias como precursores importantes, que podem servir como intermediários ou como blocos de construção quirais (“chiral building blocks”) na síntese de diversos compostos quirais de importância biológica.²⁹ Um exemplo de síntese comercial que utiliza como precursor um álcool aromático quiral, é a síntese do fármaco antidepressivo Cloridrato de Fluoxetina, comercializado como Prozac®. Nesta rota é utilizado um organoborano (Ipc_2BCl) como redutor quiral para gerar o álcool enantiomericamente puro (FIGURA 8).³⁰

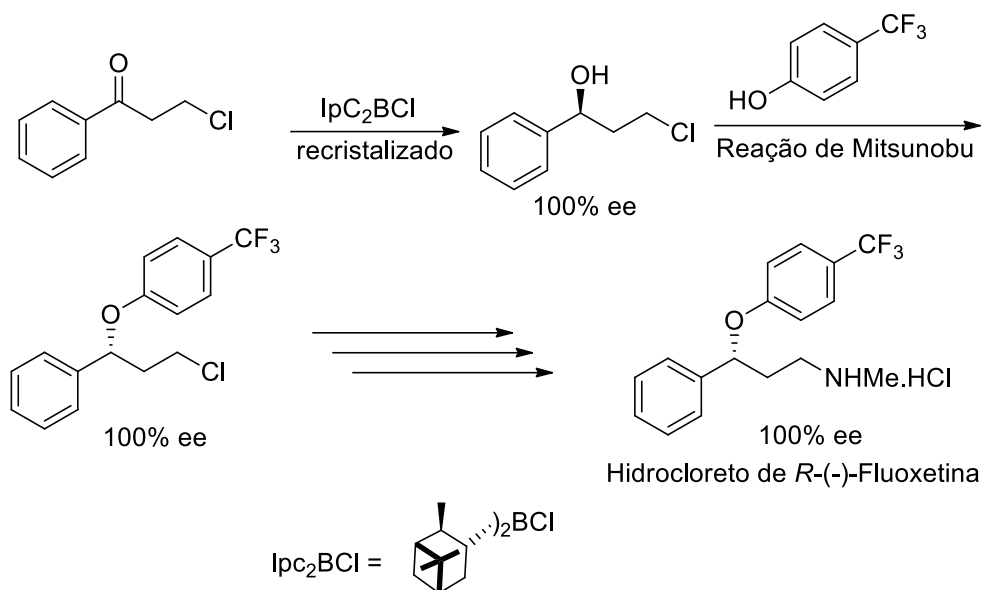


FIGURA 8– SÍNTESE DO FÁRMACO CLORIDRATO DE FLUOXETINA, DE NOME COMERCIAL PROZAC®

Para a resolução de racematos de álcoois secundários existe uma convenção de restrição estérica, oriunda de uma regra que prevê a enantiopreferência das lipases, conhecida como regra de Kazlauskas. Essa regra leva em consideração o volume dos substituintes ao redor do centro estereogênico a ser resolvido e o seu encaixe no sítio ativo da lipase, que consiste de duas regiões de tamanhos diferentes, um grande e outro menor (FIGURA 9 - a).³¹

Tomando como referência o grupo hidroxila do álcool projetado para trás do plano, o grupo grande (G) fica à esquerda, e o grupo médio (M) à direita da hidroxila (FIGURA 9 - I). Assim, os grupos G e M são acomodados em cavidades da estrutura proteica condizentes com os tamanhos destes grupos. Quando o outro enantiômero interage com a enzima o substrato é forçado a acomodar seu substituinte maior na cavidade menor do sítio ativo (FIGURA 9 - II), que é um encaixe energeticamente desfavorecido, pois a interação entre o substituinte volumoso (G) e a cavidade menor do sítio ativo perturba a tríade catalítica, diminuindo a velocidade da reação para este enantiômero.³²

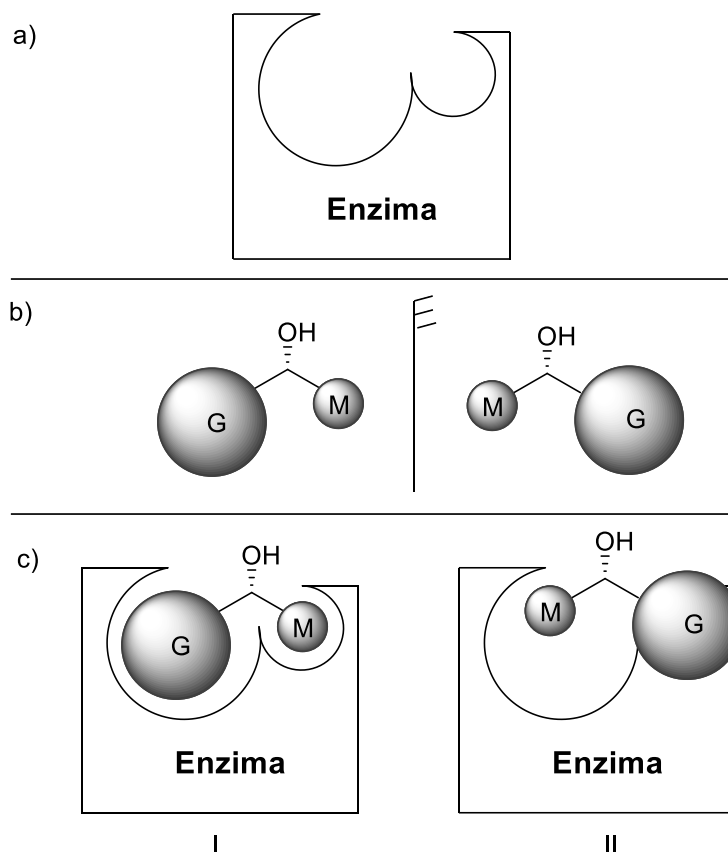


FIGURA 9 – a) MODELO DE SÍTIO ATIVO DERIVADO DA REGRA DE KAZLAUSKAS; b) ENANTIÔMEROS DE ÁLCOOL SECUNDÁRIO ESTERICAMENTE IMPEDIDO, ONDE: (L) É O GRUPO GRANDE E (M) O GRUPO MÉDIO; c) A DIFERENÇA DE COMPLEMENTARIDADE ESTÉRICA RESULTA EM DIFERENÇAS DE VELOCIDADES: (I) ENANTIÔMERO DE REAÇÃO MAIS RÁPIDA E (II) ENANTIÔMERO DE REAÇÃO MAIS LENTA NO MODELO SÍTIO ATIVO PARA LIPASES DERIVADO DA REGRA DE KAZLAUSKAS E COL. (1991)³²

Apesar da série bastante extensa de álcoois utilizada no trabalho de Kazlauskas, apenas três enzimas foram empregadas (colesterol esterase, lipase de *Pseudomonas cepacia* e lipase de *Candida rugosa*) e, a partir dos resultados obtidos para estas enzimas, estes foram extrapolados para as demais hidrolases. Desta maneira, a regra restringe o volume do grupo (M) para isósteros do grupo metila ou, em alguns casos etila, uma vez que, para as enzimas testadas, o aumento de tamanho e volume do grupo (M), levou a uma diminuição da estereosseletividade por parte das enzimas, convencendo-se que álcoois com grupo (M) maior (ou mais volumoso) do que etila não são satisfatoriamente resolvidos por lipases. Desta maneira, abordagens biocatalíticas para síntese álcoois estericamente impedidos, ou seja, com os grupos M e L com volumes maiores do que o grupo metila, etila ou semelhantes permanecem escassas.

Esta regra de restrição estérica também era observada para reação de biorredução de cetonas, na qual a presença de dois grupos volumosos ao redor da

carbonila foi tomada como obstáculo devido à baixa estereosseletividade. No entanto, recentemente Kroutil e colaboradores identificaram uma álcool desidrogenase de *Ralstonia sp.*, que mediou a biorredução de cetonas estericamente impedidas, levando aos respectivos álcoois com até 99% de excesso enantiomérico (FIGURA 10).³³

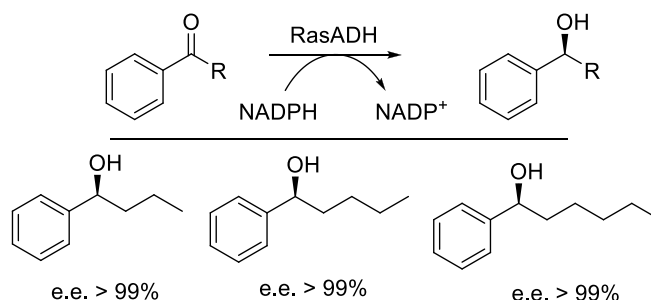


FIGURA 10- EXEMPLO DE REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO ESTEREOSSELETIVAS DE CETONAS ESTERICAMENTE IMPEDIDAS³³

O estudo de biorredução de cetonas realizado por Kroutil e colaboradores demonstrou que era um equívoco acreditar que todos os parâmetros reacionais para as reações biocatalisadas estavam estabelecidos, e que a busca de enzimas capazes de mediar a biotransformação de compostos estericamente impedidos, ou outras reações, pode ser uma alternativa viável e que precisa ser continuamente investigada, podendo levar a descoberta de uma nova enzima com seletividade (régio, químico, estereo-) que foge as regras estabelecidas. Desta maneira, a identificação de lipases capazes de catalisar reações de resolução cinética de compostos estericamente impedidos pode resultar em vantagem sobre a metodologia de biorredução, pois em uma reação RCE todos os estereoisômeros podem ser obtidos separadamente no final do processo.

Com base nisso, foi proposto um estudo que empregasse lipases de metagenômica na biotransformação de álcoois secundários quirais. A pesquisa nesse tipo de resolução é impulsionada pelo alto custo e dificuldade na realização dos métodos químicos de resolução e pelos resultados obtidos com similar e até maior excesso enantiomérico em tempos consideravelmente menores. Ainda assim, a utilização de lipases comerciais limita a aplicabilidade em larga escala desta metodologia e, por isso, faz-se necessária a obtenção de lipases com menor custo, alta produção, maior estabilidade e capacidade enantiosseletiva.²

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho de lipases inéditas, obtidas de uma biblioteca de metagenômica, em reações de resolução cinética de álcoois, incluindo os estericamente impedidos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar por métodos químicos e purificar álcoois racêmicos derivados do 1-feniletanol com substituintes de diferentes efeitos no anel aromático.
- Sintetizar por métodos químicos e purificar álcoois racêmicos com grupos alquila e arila volumosos dispostos ao redor da funcionalidade.
- Sintetizar por métodos químicos e purificar ésteres derivados dos álcoois racêmicos
- Caracterizar todos os compostos racêmicos por técnicas espectrométricas de infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, e espectrometria de massas.
- Avaliar a enantiosseletividade das lipases CAL B, de *Candida rugosa*, de *Burkholderia cepacia* LTEB11, LipC6G9 e LipC12 em reações de transesterificação frente aos álcoois sintetizados.
- Avaliar a enantiosseletividade das lipases CAL B, de *Candida rugosa*, de *Burkholderia cepacia* LTEB 11, LipC6G9 e LipC12 em reações de hidrólise frente aos ésteres sintetizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INTERESSE

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em um espectrômetro Bruker DPX200 operando em 200 MHz para o núcleo de hidrogênio e 50 MHz para carbono. Os deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C são expressos em relação ao CHCl_3 interno ($\delta_{\text{H}} = 7,26$ ppm) e CDCl_3 ($\delta_{\text{C}} = 77,0$ ppm) ou tetrametilsilano ($\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm). Dados de RMN de ^1H são relatados como se segue: deslocamento químico em ppm (δ), multiplicidade (s = singlete, d = duplete, t = tripleto, q = quarteto, m = multiplete, etc), constante de acoplamento (Hz) e integral. Dados de RMN de ^{13}C são relatados como se segue: deslocamento químico em ppm (δ).

Os espectros de massas obtidos foram realizados em um CG-EM Shimadzu QP- 5050A com coluna capilar DB-5 com ionização por impacto de elétrons (70 eV) injetor do modo split a 250 °C com programa de temperatura de 50 °C iniciais por 1 minuto, rampa de 7 °C/minuto até 250 °C por 10 minutos com fluxo de hélio de 1 mL/minuto.

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrômetro BOMEM MB100, em pastilha de KBr, na região de 400 a 4000 cm^{-1} .

As análises via cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de vidro, utilizando-se sílica gel 60G (F 254) da Vetec®. As eluições foram feitas em solventes orgânicos puros ou combinados. As revelações das placas foram obtidas por irradiação com lâmpada ultravioleta em 254/366nm, iodo ressublimado e revelador de vanilina sulfúrica.

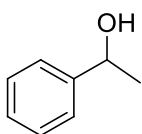
As purificações via cromatografia em coluna foram realizadas em coluna de vidro, utilizando-se sílica flash 60 (220-440 mesh) da Sigma-Aldrich®. O diâmetro interno e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material a ser purificado. As eluições foram feitas em solventes orgânicos combinados e as frações coletadas foram evaporadas sob pressão reduzida, em evaporador rotativo.

Na síntese dos compostos foram utilizados os seguintes reagentes: acetofenona (Vetec®), sulfato de magnésio (Baker®), magnésio (Merck®), iodo

(Vetec[®]), bromobenzeno (Fisher[®]), brometo de *n*-propila (Vetec[®]), cloreto de amônio (Q.M.[®]), butiraldeído (Ried[®]), pentaldeído (Aldrich[®]), borohidreto de sódio (Nuclear[®]), anidrido acético (Biotec[®]) e piridina (Sigma-Aldrich[®]). Os solventes utilizados nas sínteses foram: CH₂Cl₂, THF, acetato de etila, hexano e metanol. Todos os reagentes e solventes foram purificados de acordo com metodologias descritas na literatura.³⁴

4.1.1 Síntese de álcoois **1**, **2** e **3** via redução química com NaBH₄

Em um balão de 250 mL, foram adicionados a acetofenona de interesse (50 mmol) e metanol (50 mL). A solução resultante foi resfriada a 0 °C, em seguida o NaBH₄ (2,08 g, 55 mmol) foi adicionado em pequenas porções. Na sequência o banho de gelo foi removido e a reação foi mantida à temperatura ambiente. O progresso da reação foi acompanhado via cromatografia em camada delgada (CCD), e após o consumo do material de partida, o solvente foi evaporado e ao resíduo foi adicionado H₂O (10 mL) e o pH corrigido para 6 com solução de HCl. Em seguida, a fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (3 x 15 mL), as porções orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄, filtradas e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Os produtos brutos foram purificados por cromatografia flash com eluente composto por 9:1 hexano/acetato de etila.



C₈H₁₀O
MM: 122,07 g.mol⁻¹

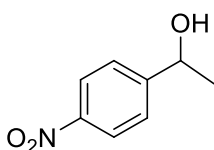
1-feniletanol (**1**) Rendimento: 80%.

CG-EM (70 eV), *m/z* (intensidade relativa): 122 (M⁺, 34%); 107 (90%); 79 (100%); 77(54%); 51 (21%); 43 (24%).

IV (cm⁻¹): 3349, 2965, 1882, 1489, 1448, 1384, 1077, 760, 699.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,45 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); 2,30 (s largo, 1H); 4,83 (q, *J* = 6,4 Hz, 1H); 7,29 (m, 5H).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 25,1; 70,3; 125,4; 127,4; 128,4; 145,8.



C₈H₉NO₃
MM: 167,06 g.mol⁻¹

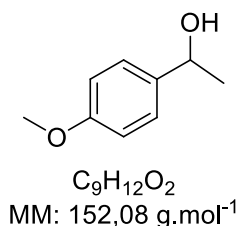
p-nitro-1-feniletanol (**2**) Rendimento: 90%.

CG-EM (70 eV), *m/z* (intensidade relativa): 166 (M⁺, 1%); 152 (100%); 122 (25%); 107(75%); 94 (41%); 77 (89%); 51 (30%); 43 (58%).

IV (cm⁻¹): 3373, 2972, 2827, 2353, 1934, 1800, 1595, 1336, 1098, 1009, 837, 707, 543.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 1,56 (d, J = 6,6 Hz, 3H); 2,85 (s, 3H); 5,00 (q, J = 6,5 Hz, 1H); 7,52 (d, J = 8,6 Hz, 2H); 8,14 (d, J = 8,7 Hz, 2H).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 24,9; 55,2; 69,9; 113,8; 126,6; 138,0; 158,9.



p-metoxi-1-feniletanol (**3**) Rendimento: 82%.

CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 152 (M^+ , 30%); 137 (100%); 109 (64%); 94 (35%); 77 (32%); 43 (21%).

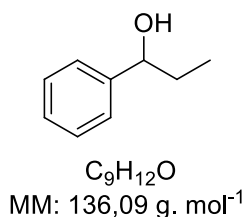
IV (cm^{-1}): 3383, 2972, 2832, 2364, 2057, 1887, 1602, 1502, 1459, 1305, 1088, 831, 809, 585, 546.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 1,46 (d, J = 6,4 Hz, 3H); 4,84 (q, J = 6,3 Hz, 1H); 6,87 (d, J = 8,2 Hz, 2H); 7,28 (d, J = 8,4 Hz, 2H).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 25,4; 69,4; 123,7; 126,1; 153,1.

4.1.2 Síntese do álcool **4**

Em um balão de 25 mL, com duas bocas, acoplado a um condensador de refluxo, sob atmosfera de N_2 , foram adicionados magnésio (600 mg, 25 mmol) previamente ativado, e um cristal de iodo. O sistema foi flambado e depois de resfriado, adicionou-se o THF anidro (15 mL) e em seguida o brometo de propila (3 mL, 25 mmol). Após o consumo do magnésio, o sistema foi resfriado a 0 °C com auxílio de banho de gelo e adicionou-se gota-a-gota durante quinze minutos o benzaldeído (25 mmol; 2,6 mL). Na sequência o banho de gelo foi retirado e a reação foi aquecida à temperatura ambiente. O progresso da reação foi acompanhado via cromatografia em camada delgada (CCD), e após o consumo do material de partida, adicionou-se 15 mL de solução saturada de NH_4Cl . A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (3 x 15 mL), as porções orgânicas foram combinadas, secas com MgSO_4 anidro, filtradas e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado via cromatografia líquida em coluna de sílica gel utilizando-se a mistura *n*-hexano:acetato de etila (9:1) como eluente.



1-fenilpropanol (**4**) Rendimento: 80%.

CG-EM (70 eV), *m/z* (intensidade relativa): 136 (M⁺, 17%); 107 (100%); 91 (5%); 79 (79%); 77 (35%); 51 (10%).

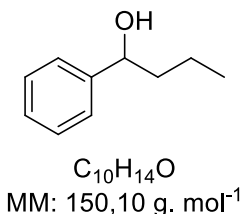
IV (cm⁻¹): 3337, 3029, 2880, 1828, 1500, 1451, 1203.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 0,88 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H); 1,77 (m, 2H); 2,23 (s largo, 1H); 4,54 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H); 7,31 (m, 5H).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 10,1; 31,8; 75,9; 128,0; 127,4; 128,3; 144,6.

4.1.3 Síntese de álcoois **5** e **6**

Em um balão de 25 mL, com duas bocas, acoplado a um condensador de refluxo, sob atmosfera de N₂, foram adicionados magnésio (600 mg, 25 mmol) previamente ativado, e um cristal de iodo. O sistema foi flambado e depois de resfriado, adicionou-se o THF anidro (15 mL) e bromobenzeno (2,7 mL; 25 mmol). Após o consumo do magnésio, o sistema foi resfriado a 0 °C com o auxílio de banho de gelo e adicionou-se gota a gota durante quinze minutos o aldeído de interesse (25 mmol). Na sequência o banho de gelo foi removido e a reação foi aquecida à temperatura ambiente. O progresso da reação foi acompanhado via cromatografia em camada delgada (CCD), e após o consumo do material de partida, adicionou-se 15 mL de solução saturada de NH₄Cl. A fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (3 x 15 mL), as porções orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄, filtradas e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Os produtos brutos foram purificados por cromatografia flash com eluente composto por 9:1 hexano/acetato de etila.



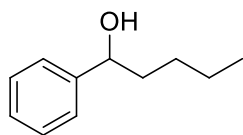
1-fenilbutanol (**5**) Rendimento: 80%.

CG-EM (70 eV), *m/z* (intensidade relativa): 150 (M⁺, 9%); 117 (30%); 115 (15%); 107 (100%); 79 (70%); 77 (41%); 51 (13%).

IV (cm⁻¹): 3357, 3074, 2937, 1837, 1440, 1198.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 0,90 (t, *J* = 7,2, 3H); 1,35 (m, 2H); 1,67 (m, 2H); 2,21 (s, 1H); 4,62 (dd, *J* = 6 Hz e 7,3 Hz, 1H); 7,30 (m, 5H).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 13,9; 19,0; 41,2; 74,3; 125,9; 127,4; 128,3; 144,9.



$C_{11}H_{16}O$
MM: 164,12 g. mol⁻¹

1-fenilpentanol (**6**) Rendimento: 60%.

CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 164 (M^+ , 5%); 120 (12%); 107 (100%); 104 (33%); 91 (9%); 79 (61%); 77 (42%); 51(10%).

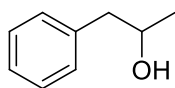
IV (cm⁻¹): 3346, 2934, 1877, 1494, 1463, 1194.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 0,87 (t, J = 7,0, 3H); 1,30 (m, 4H); 1,73 (m, 2H); 2,07 (s largo, 1H); 4,62 (t; J = 6,8 Hz; 1H); 7,30 (m, 5H).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 13,9; 22,6; 27,9; 38,8; 74,6; 125,8; 127,4; 128,4; 144,9.

4.1.4 Purificação do álcool **7**

O composto **7** foi obtido da Merck-Alemanha®, devidamente purificado através de destilação sob vácuo, e caracterizado.



$C_9H_{12}O$
MM: 136,09 g.mol⁻¹

1-fenilpropan-2-ol (**7**):

CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 136 (2,7%); 121 (2,8%); 115 (2%); 103 (4%); 92 (100%); 91 (70%); 77 (3,7%); 65 (14%); 51 (4,5%); 45 (26%); 43 (6,2%).

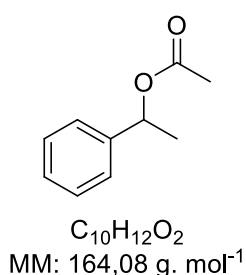
IV (cm⁻¹): 3356, 2966, 1819, 1494, 1455, 1364, 1120, 1064, 933, 845, 742, 710, 621, 496.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,20 (d, J = 6,2, 3H); 1,96 (s, 1H); 2,70 (m, 2H); 3,96 (sext, J = 6,2, 1H); 7,22 (m, 5H).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 22,7; 45,8; 69,1; 126,4; 128,5; 129,4; 138,6.

4.1.5 Síntese dos ésteres de interesse: **1a**, **2a**, **3a**, **4a**, **5a**, **6a** e **7a**

Em um balão de 25 mL, com duas bocas, adicionou-se o álcool de interesse (25 mmol), anidrido acético (50 mmol; 4,7 mL) e piridina (15 mL). Deixou-se reagir à temperatura ambiente e agitação magnética durante a noite. Em seguida, o conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação, diluído com acetato de etila (20 mL) e lavado com porções de solução de sulfato de cobre (3 X 10 mL) até observar-se a remoção da piridina. Na sequência, a fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente evaporado. Os produtos brutos foram purificados por cromatografia flash com eluente composto por 9:1 hexano/acetato de etila.



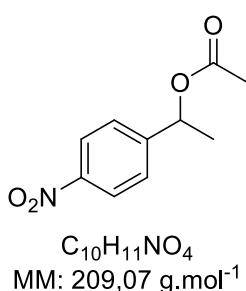
Acetato de 1-feniletila (**1a**) Rendimento: 75%.

CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 164 (M^+ , 23%); 122 (100%); 105 (67%); 104 (89%); 107 (36%); 51 (15%); 43 (55%).

IV (cm⁻¹): 3029, 2969, 1749, 1500, 1362, 1253, 1075.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,52 (d, J = 6,6 Hz, 3H); 2,06 (s, 3H); 5,87 (q, J = 6,6 Hz, 1H); 7,33 (m, 5H).

RMN de ¹³C (50 MHz - CDCl₃), δ (ppm): 21,3; 22,1; 72,3; 126,0; 127,8; 128,5; 141,6; 170,2.



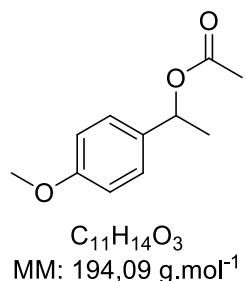
Acetato de *p*-nitro-1-feniletila (**2a**) Rendimento: 82%.

CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 209 (M^+ , 1%); 167 (56%); 150 (16%); 119 (23%); 103 (24%); 91 (29%); 77 (30%); 43 (100%).

IV (cm⁻¹): 2961, 2353, 1725, 1602, 1510, 1355, 1242, 1067, 851, 697, 604, 532.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,56 (d, J = 6,6 Hz, 3H); 2,11 (s, 3H); 5,92 (q, J = 6,7 Hz, 1H); 7,51 (d, J = 8,8 Hz, 2H); 8,21 (d, J = 8,7 Hz, 2H).

RMN de ¹³C (50 MHz - CDCl₃), δ (ppm): 21,1; 22,2; 71,2; 123,8; 126,7; 148,9; 170,0.



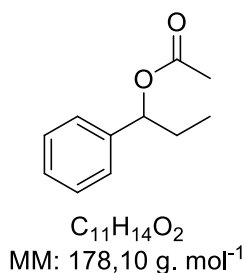
Acetato de *p*-metoxi-1-feniletila (**3a**) Rendimento: 86%.

CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 194 (M^+ , 27%); 134 (100%); 119 (40%); 105 (22%); 91 (33%); 77 (20%); 43 (34%).

IV (cm⁻¹): 2981, 2838, 2353, 2065, 1890, 1736, 1622, 1510, 1376, 1242, 1180, 1036, 831, 603, 552.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,51 (d, J = 6,5 Hz, 3H); 2,03 (s, 3H); 3,77 (s, 3H); 5,84 (q, J = 6,6 Hz, 1H); 6,87 (d, J = 8,7 Hz, 2H); 7,29 (d, J = 8,7 Hz, 2H).

RMN de ¹³C (50 MHz - CDCl₃), δ (ppm): 21,3; 21,9; 55,1; 71,9; 113,8; 127,5; 133,7; 159,2; 170,3.



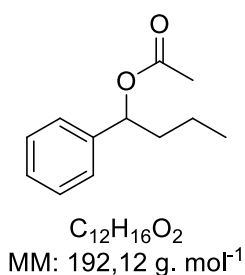
Acetato de 1-fenilpropila (**4a**) Rendimento: 70%.

CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 178 (15%); 149 (25%); 136 (51%); 117 (50%); 107 (100%); 91 (37%); 79 (22%); 77 (20%); 43 (65%).

IV (cm⁻¹): 3027, 2955, 1738, 1453, 1355, 1246, 1023.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 0,87 (t, J = 7,3 Hz, 3H); 1,89 (m, 2H); 2,07 (s, 1H); 5,65 (t, J = 6,9 Hz, 1H); 7,3 (m, 5H).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9,8; 21,2; 29,2; 126,5; 127,8; 128,3; 140,5; 170,4.



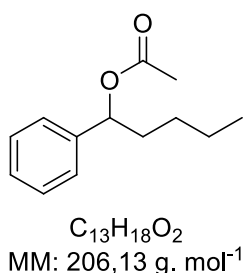
Acetato de 1-fenilbutila (**5a**) Rendimento: 60%.

CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 192 (M^+ , 14%); 150 (52%); 132 (9%); 117 (54%); 107 (100%); 91 (35%); 79 (18%); 77 (16%); 43 (62%).

IV (cm⁻¹): 3032, 2971, 1727, 1463, 1375, 1240, 1012.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 0,91 (t, J = 7,3 Hz, 3H); 1,30 (m, 2H); 1,80 (m, 2H); 2,05 (s, 3H); 5,73 (t; J = 7,0 Hz; 1H); 7,31 (m, 5H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 13,8; 18,8; 21,3; 38,4; 75,9; 126,5; 127,8; 140,8; 170,3.



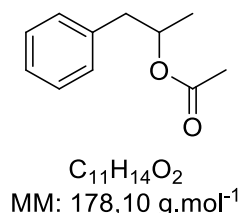
Acetato de 1-fenilpentila (**6a**) Rendimento: 70%.

CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 206 (M^+ , 10%); 164 (43%); 149 (30%); 117 (39%); 107 (100%); 104 (23%); 91 (30%); 79 (16%); 77 (13%); 43 (64%).

IV (cm⁻¹): 3032, 2954, 1733, 1458, 1370, 1241, 1022.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 0,87 (t; J = 6,6 Hz; 3H); 1,29 (m, 4H); 1,84 (m, 2H); 2,06 (s, 3H); 5,72 (t; J = 6,9 Hz; 7,6 Hz, 1H); 7,32 (m, 5H).

RMN de ¹³C (50 MHz - CDCl₃), δ (ppm): 13,8; 21,3; 22,4; 27,6; 36,0; 76,1; 126,5; 127,7; 128,4; 140,8; 170,3.



Acetato de 1-fenilprop-2-ila (**7a**) Rendimento: 80%.

CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 179,1 (M^+ , 0,01%); 118 (70%); 91 (33%); 43 (100%).

IV (cm⁻¹): 2987, 1729, 1555, 1443, 1360, 1240, 1149, 1059, 961, 758, 698, 599, 495.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1,21 (d, J = 6,3, 3H); 1,99 (s, 3H); 2,83 (dq, J = 6,7 Hz, 2H); 5,11 (sex, J = 6, 2 Hz, 1H); 7,20 (m, 5H).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 19,4; 21,2; 42,2; 71,4; 126,4; 128,3; 129,3; 137,6; 170,5.

4.2 OBTENÇÃO DAS ENZIMAS PARA AVALIAÇÃO COMO BIOCATALISADORES

As três lipases não-comerciais empregadas neste trabalho foram isoladas e identificadas no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB-UFPR), e cedidas pela Professora Nadia Krieger.

As lipases LipC6G9 e LipC12 foram obtidas de uma biblioteca metagenômica construída por Glogauer e colaboradores, e gentilmente cedidas pelo professor Emanuel Maltempi de Souza,³⁵ a partir de uma amostra de solo contaminado com gordura animal, e são as primeiras lipases de metagenômica aplicadas a reações de síntese orgânica.

A lipase de *B. cepacia* LTEB11 foi produzida por fermentação submersa, e imobilizada em suporte hidrofóbico Accurel MP 1000®, conforme descrito por Salum (2010).³⁶

As lipases LipC6G9, LipC12 e a lipase de *Burkholderia cepacia* apresentam estabilidade e atividade em solventes orgânicos mas nunca foram exploradas em reações orgânicas mais elaboradas, como a biotransformação enantiosseletiva de compostos orgânicos.

4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE

A atividade de hidrólise foi determinada a partir da quantificação espectrofotométrica do teor de ácido oleico durante as reações de hidrólise da trioleína em meio orgânico.^{37; 38} Para a reação de hidrólise, em um erlenmeyer foram adicionados 20 mg da enzima imobilizada, 4,9 mL de *n*-heptano, 70 mmol L⁻¹ de trioleína e 0,1 mL (2% v/v) de água destilada. A reação foi realizada sob agitação de 180 rpm, a 35 °C. Em intervalos fixos (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos), alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional e adicionadas a eppendorfs contendo 1,15 mL de tolueno e o reativo de cor (250 µL), que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5%), com pH (6,0 - 6,2) corrigido previamente com piridina. Foram adicionados 100 µL da amostra e a mistura foi agitada em vórtex durante 40 segundos e a absorbância da fase orgânica lida em espectrofotômetro a 715 nm.

A concentração de ácido graxo no meio é relacionada à absorbância pela curva de calibração feita com o ácido oleico (Sigma, pureza 90%), que foi obtida nas mesmas condições do ensaio. Nas reações de hidrólise, a atividade foi calculada a partir da liberação dos ácidos graxos no meio reacional e uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover a produção de 1 µmol de ácidos graxos por minuto nas condições do ensaio.

4.2 AVALIAÇÃO DA ENANTIOSSELETIVIDADE DAS LIPASES: CAL B, *C. rugosa*, *B. cepacia*, LipC6G9 e LipC12.

4.2.1 Reação de transesterificação dos compostos **1** a **7** catalisada pelas lipases CAL B, *C. rugosa*, *B. cepacia*, LipC6G9 e LipC12.

A frasco de vidro de 3 mL com tampa, foram adicionados o álcool de interesse (**1** a **7**; 0,1 mmol), acetato de vinila (0,5 mmol; aproximadamente 0,15 mL), hexano (2 mL) e 100 mg de enzima imobilizada, com excessão à CAL B que foram adicionados 20 mg. A reação foi realizada à 35 °C e sob agitação magnética. O progresso das reações foi acompanhado via cromatografia gasosa e ou cromatografia líquida de alta eficiência com coletas de alíquotas de 100 µL de 0 a 216 horas.

4.2.2 Reação de hidrólise dos compostos **1a** a **7a** catalisada pelas lipases CAL B, *C. rugosa*, *B. cepacia*, LipC6G9 e LipC12.

A um vial de 3 mL, foram adicionados o éster de interesse (**1a** a **7a**; 0,1 mmol), água (0,2 mL), hexano (2 mL) e 100 mg de enzima imobilizada, com excessão à CAL B que foram adicionados 20 mg. A reação foi realizada à 35 °C e sob agitação magnética. O progresso das reações foi acompanhado via cromatografia gasosa e/ou cromatografia líquida de alta eficiência, com coletas de alíquotas de 100 µL de 0a 216 horas.

4.2.3 Resolução cromatográfica dos álcoois e ésteres

Para os álcoois **1**, **2**, **4** e **6** e seus ésteres correspondentes, as análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso, equipamento Shimadzu modelo GC-2010 com detector de ionização em chama (FID) e coluna capilar quiral Chirasil – Dex CB com 25 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e fase estacionária de β -ciclodextrina. A temperatura do injetor split 220 °C, e do detector FID 220 °C. O volume de injeção foi de 1 µL, com razão de split de 1:20. Os dados foram coletados por meio do software GC Real Time®. As rampas utilizadas no cromatógrafo a gás foram:

- Compostos **1** e **1a**: 110 °C até 120 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min; T_R : (*R*)-**1**: 4,29 min, (*S*)-**1**: 4,57 min, (*R*)-**1a**: 3,81 min e (*S*)-**1a**: 3,57 min.
- Compostos **2** e **2a**: 160 °C até 172 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min; T_R : (*R*)-**2**: 8,10 min, (*S*)-**2**: 8,57, (*R*)-**2a**: 5,61 min e (*S*)-**2a**: 5,43.
- Compostos **4** e **4a**: 60 °C até 110 °C com taxa de aquecimento de 2 °C/min; T_R : (*R*)-**4**: 23,35 min, (*S*)-**4**: 23,92 min, (*R*)-**4a**: 19,28 min e (*S*)-**4a**: 18,55 min.
- Compostos **6** e **6a**: 60 °C até 120 °C com taxa de aquecimento de 2 °C/min T_R : (*R*)-**6**: 20,44 min, (*S*)-**6**: 21,76 min, (*R*)-**6a**: 27,95 min e (*S*)-**6a**: 28,08 min.

Para os compostos **3**, **5** e **7** e seus ésteres correspondentes foi utilizado o Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência Shimadzu LC-6AD com detector UV-Vis em 215 nm e Coluna Phenomenex-Lux de fase estacionária de Cellulose-1 3 µm, com dimensões 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro; volume de injeção de 4 µL, fase móvel Hexano:Isopropanol (95:5) durante 20 minutos;

- Compostos **3** e **3a**: T_R : (*R*)-**3**: 17,609 min, (*S*)-**3**: 18,425 min, (*R*)-**3**: 6,84 min, (*S*)-**3**: 7,11 min.
- Compostos **5** e **5a**: T_R : (*R*)-**3**: 17,609 min, (*S*)-**3**: 18,425 min, (*R*)-**3**: 6,84 min, (*S*)-**3**: 7,11 min.
- Compostos **7** e **7a**: T_R : (*R*)-**3**: 17,609 min, (*S*)-**3**: 18,425 min, (*R*)-**3**: 6,84 min, (*S*)-**3**: 7,11 min.

4.2.4 Determinação das configurações absolutas dos compostos nas reações de RCE

As configurações absolutas dos enantiômeros de todos os compostos foram determinadas por comparação com as configurações absolutas encontradas na literatura para a CAL-B^{39;40;41} e foram obtidas através da comparação dos tempos de

retenção obtidos na reação de resolução cinética enzimática com a enzima comercial CAL B com os tempos de retenção do cromatograma padrão. Como ilustrado para os compostos **1** e **1a**, em que os cromatogramas da reação de transesterificação do composto **1** (FIGURA 12) e da reação de hidrólise do composto **1a** (FIGURA 13) foram comparados com o cromatograma padrão (FIGURA 11).

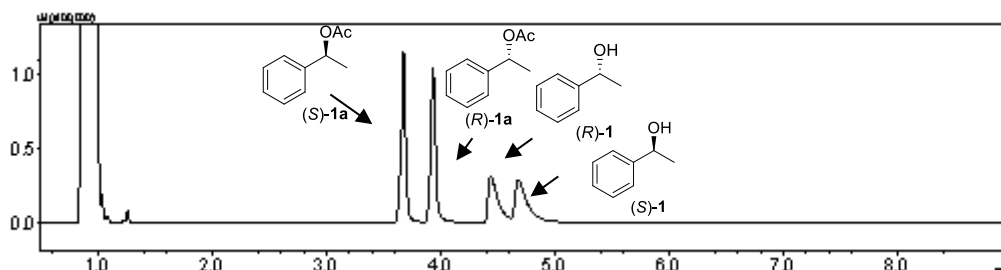


FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS **1** E **1a** EMPREGADOS COMO PADRÕES CROMATOGRÁFICOS.

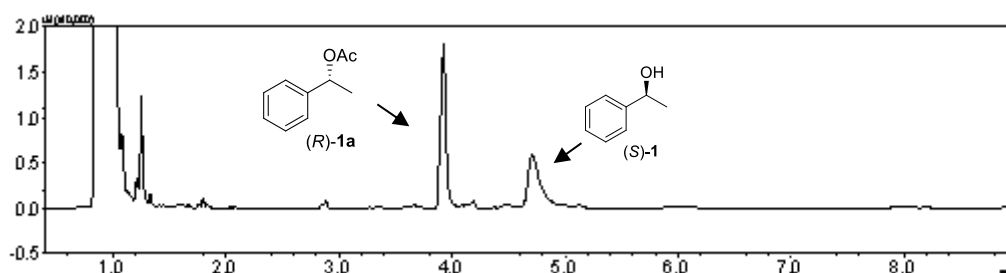


FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO COMPOSTO **1** MEDIADA POR CAL B

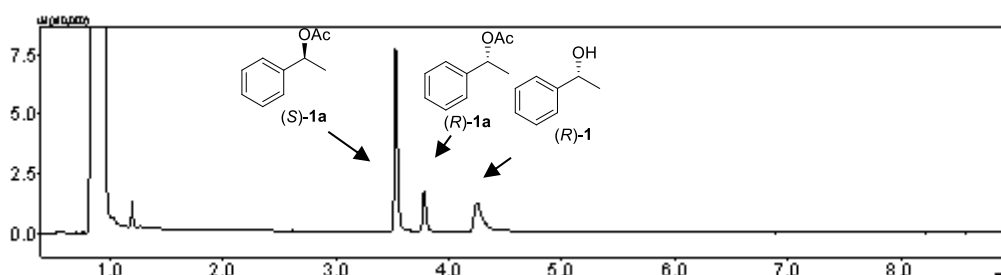


FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO COMPOSTO **1a** MEDIADA PELA LIPASE CAL B

4.2.5 Determinação da conversão e excessos enantioméricos das reações de RCE

A pureza enantiomérica dos compostos presentes nas reações de resolução cinética foi expressa em valores de excessos enantioméricos de substrato (ee_s) e produto (ee_p) e foram determinados pela diferença de porcentagens relativas de cada enantiômero, onde R é área do pico correspondente ao enantiômero (R) e S é a área do pico correspondente ao enantiômero (S). Assim, para uma mistura racêmica o valor de ee é zero e, para um composto enantiomericamente puro é 1(ou 100%).

Os valores de conversão (c) e razão enantiomérica (E), como a determinação foi pontual, ou seja, utilizando-se um único tempo de reação e baseadas em reações uni-uni e irreversíveis, foram determinados considerando-se o valor de conversão e ee_s , a partir das seguintes Equações:⁴²

$$c = \frac{ees}{ees + eep} \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

EQUAÇÃO 2

Razão enantiomérica (E) para o substrato

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ees)]}{\ln[(1 - c)(1 + ees)]}$$

EQUAÇÃO 3

Razão enantiomérica (E) para o produto

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - eep)]}{\ln[(1 - c)(1 + eep)]}$$

Onde ee_s corresponde ao excesso enantiomérico do substrato (%), ee_p corresponde ao excesso enantiomérico do produto (%), c corresponde à conversão (%) e E é a razão enantiomérica. Com estas equações é possível observar que um valor de E igual a 1 corresponde a uma reação não-seletiva. Para uma resolução cinética ser considerada aceitável o valor de E deve ser no mínimo, 20.⁴³

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INTERESSE

A primeira etapa do trabalho consistiu na síntese, caracterização e resolução cromatográfica dos álcoois (FIGURA 14) e ésteres de interesse (FIGURA 15) para posterior utilização em reações enzimáticas. Estes compostos foram sintetizados através de metodologias sintéticas bem estabelecidas: os álcoois foram preparados pela redução química de cetonas com borohidreto de sódio (NaBH_4), ou a adição de uma espécie de Grignard a aldeídos. No caso dos ésteres, empregou-se a acetilação química dos respectivos álcoois com anidrido acético.

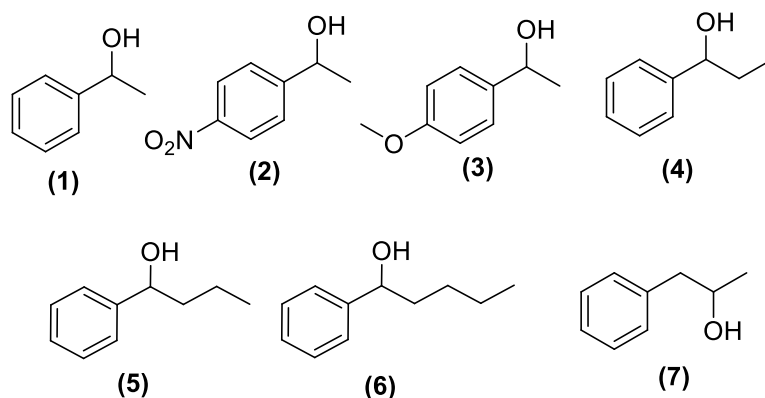


FIGURA 14- ÁLCOOIS INTERESSE SINTETIZADOS

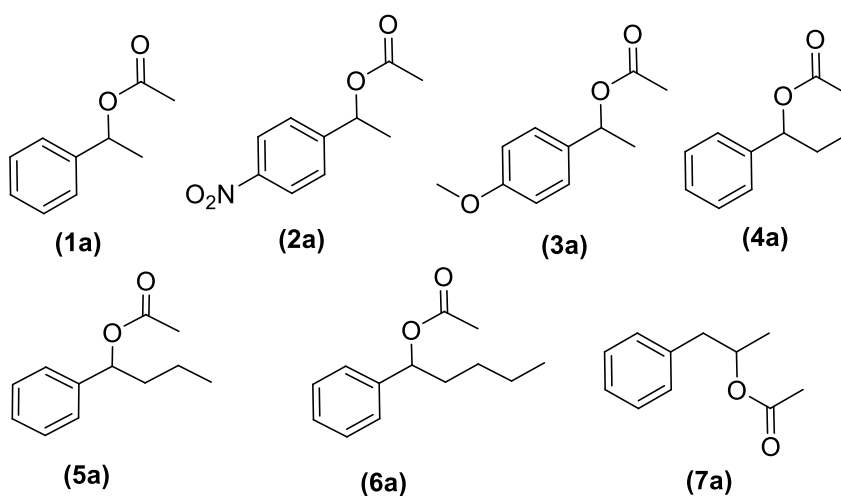
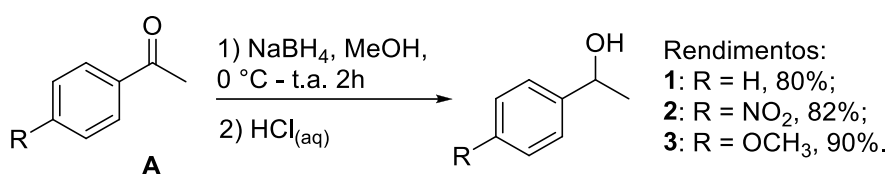


FIGURA 15 - ÉSTERES DERIVADOS DOS ÁLCOOIS DE INTERESSE

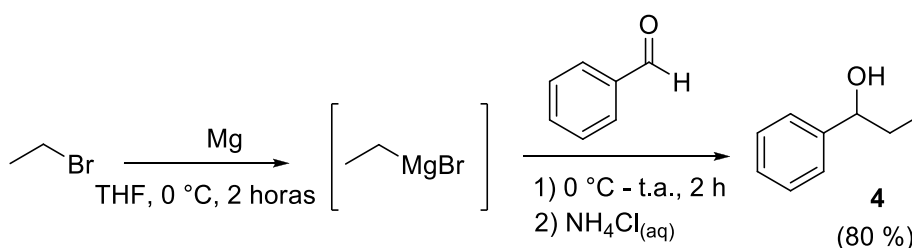
5.1.1 Síntese dos álcoois 1-7

Os álcoois **1-3** foram obtidos pela redução química da acetofenona de interesse (A) empregando NaBH₄ como agente redutor (ESQUEMA 1). Os resíduos oriundos da reação eram líquidos amarelo esverdeado, exceto o composto **2** que era amarelo, e foram purificado através cromatografia flash. Após a purificação, os produtos **1** e **3** foram obtidos na forma de óleos translúcidos, e o **2** como um óleo amarelo, com rendimentos isolados de 80 a 90%



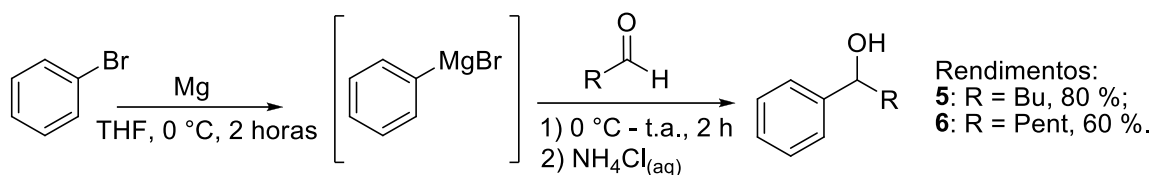
ESQUEMA 1 - SÍNTESE DOS COMPOSTOS **1**, **2** E **3** A PARTIR DA REDUÇÃO DA ACETOFENONA CORRESPONDENTE COM NaBH₄

O 1-fenilpropanol (**4**) foi sintetizado via adição do brometo de etilmagnésio, formado a partir de brometo de etila e magnésio metálico, ao benzaldeído (ESQUEMA 2). O resíduo bruto oriundo dessa reação foi um líquido amarelo esverdeado, que foi purificado através cromatografia flash. Após a purificação o produto **4** foi obtido na forma um de óleo translúcido, com rendimento isolado de 80%.



ESQUEMA 2 - SÍNTESE DO COMPOSTO **4** VIA REAÇÃO DE GRIGNARD

Os álcoois 1-fenilbutanol (**5**) e 1-fenilpentanol (**6**) foram obtidos pela adição de brometo de fenilmagnésio ao aldeído adequado (butiraldeído e pentanaldeído) (ESQUEMA 3).

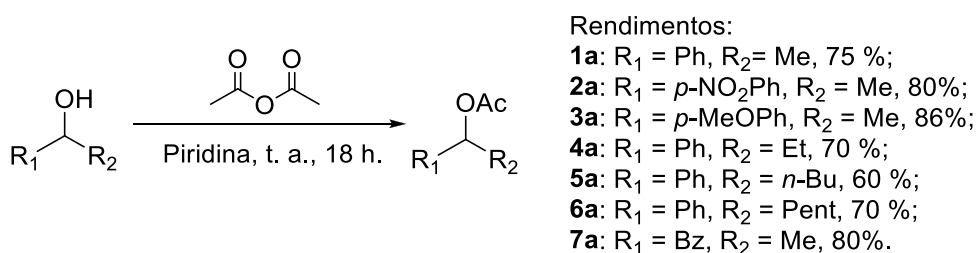
ESQUEMA 3 - SÍNTESE DOS ÁLCOOIS **5** E **6** VIA REAÇÃO DE GRIGNARD

Os resíduos obtidos nestas reações foram líquidos amarelo-esverdeados, e foram purificados através cromatografia flash. Após a purificação os produtos **5** e **6** foram obtidos na forma de óleos translúcidos, com rendimentos isolados de 80% e 60% respectivamente.

O composto **7** foi obtido da Merck-Alemanha, devidamente purificado através de destilação e caracterizado.

5.1.2 Síntese dos ésteres de interesse via acetilação química dos álcoois aromáticos

Na sequência, os álcoois **1-7** foram derivatizados aos ésteres correspondentes pela reação com anidrido acético em piridina (ESQUEMA 4). Esta derivatização foi necessária, pois os produtos esperados das reações de resolução cinética enzimática dos álcoois **1-7** são os respectivos ésteres, assim os ésteres **1a-7a** seriam utilizados como padrões cromatográficos e, além disso, a reação de hidrólise/alcoólise enzimática dos ésteres **1a-7a** também seria investigada.

ESQUEMA 4 - SÍNTESE DOS ÉSTERES **1a-7a** DE INTERESSE

Os resíduos brutos foram purificados empregando-se cromatografia flash e os rendimentos variaram de 60 a 86%.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE

A fim de padronizar as condições de reação para as enzimas escolhidas para as reações de resolução cinética enzimática, a atividade de hidrólise em meio orgânico foi determinada pelo método proposto por Gonçalves,⁴⁴ com algumas modificações. A reação avaliada foi a de hidrólise de trioleína (TC18), que é considerado um substrato padrão para lipases ditas verdadeiras, em solvente orgânico (*n*-heptano). A hidrólise do triacilglicerol resulta em ácidos graxos livres que são quantificados pelo método espectrofotométrico de Lowry-Tinsley,³⁸ como explicado no item 4.1. Os resultados demonstrados na TABELA 2, são expressos em (U), que foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover a produção de 1 μ mol de ácidos graxos por minuto nas condições do ensaio:

TABELA 2 - ATIVIDADE DE HIDRÓLISE

Enzima	Atividade U/g de suporte
CAL B	200
LipC12	103
LipC6G9	78
<i>Candida rugosa</i>	90
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	35

A partir destes resultados foi mensurada uma proporcionalidade para a massa utilizada das lipases nas reações de resolução cinética. Estipulou-se 20 mg de enzima imobilizada para a CAL B (correspondente a 4 U) e para as outras enzimas estipulou-se utilizar 100 mg (correspondente a: 10 U para a LipC12; 7 U para LipC6G9; 9 para a lipase de *C. rugosa* e 3,5 para a lipase de *B. cepacia*).

A atividade de hidrólise depende do encaixe do substrato no sítio ativo da enzima, do meio em que é realizado o teste e, neste caso, também da quantidade de proteína adsorvida no suporte. A CAL B, que obteve a maior atividade de hidrólise, é modificada geneticamente e possui um processo de imobilização já bastante otimizado, de forma que as enzimas inéditas utilizadas neste trabalho ainda precisam passar por estudos adicionais.

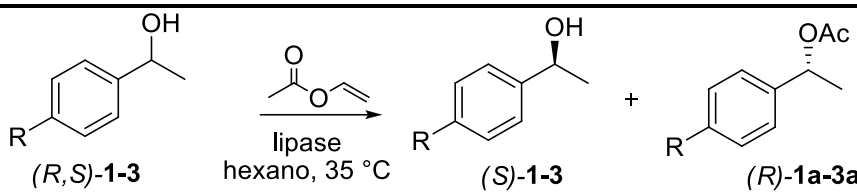
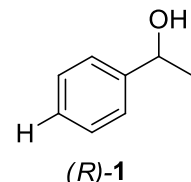
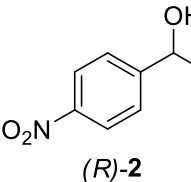
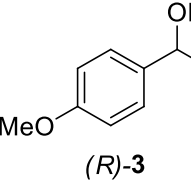
5.3 RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE DOS COMPOSTOS 1-7, E SEUS ÉSTERES CORRESPONDENTES

As cinco lipases (LipC6G9, LipC12, de *B. cepacia*, de *C. rugosa* e CAL B) foram avaliadas em reações de transesterificação em solvente orgânico (hexano) utilizando o acetato de vinila como doador de grupo acetila, e também quanto à sua atividade de hidrólise do éster correspondente, neste caso as reações foram realizadas no mesmo solvente orgânico, mas empregando água como nucleófilo. Os parâmetros conversão e pureza enantiomérica foram obtidos a partir das áreas observadas para cada composto no cromatograma e aplicação nas Equações 1-3 (página 39). As configurações absolutas dos álcoois e ésteres foram atribuídas por comparação com os dados obtidos em uma reação realizada em paralelo empregando a enzima CAL B cuja enantiopreferência na resolução cinética enzimática (RCE) destes compostos estão descritos na literatura.^{45;46;47;48;49} As reações foram acompanhadas via cromatografia gasosa por 216 horas, mas os tempos mostrados nas tabelas são aqueles em que a conversão estava mais próxima da ideal, 50%.

5.3.1 Resolução cinética enzimática dos compostos **1-3** e **1a-3a**

A fim de avaliar o potencial de aplicação das cinco lipases em síntese orgânica, na primeira etapa as enzimas foram avaliadas em reações de RCE do 1-feniletanol e derivados (álcoois **1-3** e seus ésteres **1a-3a** correspondentes) que são normalmente adotados como substratos modelo.⁵⁰ As reações de RCE dos compostos **2** e **3** e seus respectivos ésteres (**2a** e **3a**) foram realizadas a fim de avaliar a o efeito de grupos substituintes doadores e retiradores de elétrons no anel aromático na seletividade das enzimas.

TABELA 3 – REAÇÕES DE RCE DOS COMPOSTOS 1-3 MEDIADAS POR DIFERENTES LIPASES

							
Entrada	Substrato	Lipase	Tempo (h)	C (%) ^a	ee(%) ^b		E ^c
					(S)-álcool	(R)-éster	
1	 (R)-1	CAL B	2	50	99	99	>200
2		<i>C. rugosa</i>	60	43	45	58	5,7
3		<i>B. cepacia</i>	84	43	74	99	>200
4		LipC6G9	30	49	95	95	>200
5		LipC12	24	73	76	28	4
6	 (R)-2	CAL B	24	50	99	99	>200
7		<i>C. rugosa</i>	24	51	2	32	2
8		<i>B. cepacia</i>	216	27	36	99	>200
9		LipC6G9	216	12	13	99	>200
10		LipC12	216	10	12	99	>200
11	 (R)-3	CAL B	36	50	99	99	>200
12		<i>C. rugosa</i>	48	27	9	23	1,7
13		<i>B. cepacia</i>	36	31	43	99	>200
14		LipC6G9	24	47	90	98	>200
15		LipC12	24	46	81	70	20

^aconversão: $c = 100 \times (ee_s/ee_s + ee_p)$; ^bexcesso enantiomérico: determinado por comparação das áreas observadas no cromatograma; ^cRazão enantiomérica: $E = \ln \{ [e.e. P (1 - e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \} / \ln \{ [e.e. P (1 + e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \}$.

A primeira reação avaliada foi a RCE do álcool **1** via reação de transesterificação mediada pelas lipases CAL B, de *C. rugosa*, de *B. cepacia*, LipC6G9 e LipC12. Na reação mediada por CAL B, a conversão foi de 50% em duas horas, com altos valores de excesso enantiomérico, 99% para o álcool (S)-**1** e 99% para o éster (R)-**1a** (TABELA 3- entrada 1), com razão enantiomérica maior que 200 como relatado na literatura.⁴⁵ A reação mediada pela lipase de *C. rugosa* apresentou uma alta conversão (43%) em 60 horas (TABELA 3- entrada 2), mas apresentou baixa seletividade frente aos dois enantiômeros (S)-**1** e (R)-**1**, ou seja, baixo excesso enantiomérico. A reação mediada pela lipase LipC6G9 alcançou 49% de conversão em apenas 30 horas reação sendo a lipase inédita com menor tempo de reação (TABELA 3– entrada 4), seguida pela lipase de *B. cepacia* com 43% de conversão (TABELA 3– entrada 3). A reação mediada pela lipase LipC12 apesar da alta

conversão (73%) em 24 horas, apresentou baixa seletividade para os enantiômeros (S)-**1** e (R)-**1a** (TABELA 3 – entrada 5).

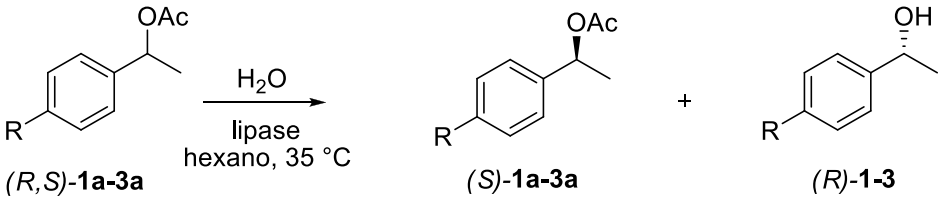
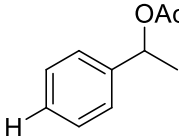
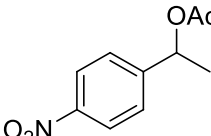
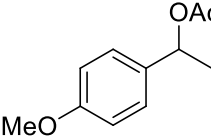
O primeiro composto com grupo substituinte no anel aromático testado frente as cinco enzimas foi o álcool **2**, que possui um grupo nitro, retirador de densidade eletrônica na posição *para*. A reação mediada pela CAL B, apresentou a conversão de 50% em 24 horas, com altos valores de excesso enantiomérico para os enantiômeros (S)-**2** e (R)-**2a** (TABELA 3 - entrada 6) e razão enantiomérica maior que 200, em menos tempo do que relatado na literatura que é de 35 horas a 30 °C,⁴⁶ mas em maior tempo que para o composto **1**, evidenciando a influência do grupo nitro para a cinética da reação. A reação mediada pela lipase de *C. rugosa* apresentou uma conversão maior que a conversão ideal já em 24 horas (51%) (TABELA 3 – entrada 7), em menos tempo que o composto **1**, mas nesse caso a enzima também catalisou a reação para os dois enantiômeros (S)-**2** e (R)-**2a**, obtendo um coeficiente enantiomérico baixo, assim como o excesso enantiomérico. O tempo de reação para as reações mediadas pelas lipases inéditas aumentou consideravelmente em relação as reações com o composto **1**, sendo a reação mediada pela lipase de *B. cepacia* com maior conversão (43%) (TABELA 3 – entrada 8).

O segundo composto com grupo substituinte no anel aromático testado frente as cinco enzimas foi o álcool **3**, que possui um grupo metoxila, doador de densidade eletrônica na posição *para*. A reação de transesterificação mediada pela CAL B, apresentou conversão de 50% em 36 horas (TABELA 3 – entrada 11), tempo maior do que para os compostos **1** e **2**, com altos valores de excesso enantiomérico para os enantiômeros (S)-**3** e éster (R)-**3a**, e razão enantiomérica maior que 200 em concordância com o descrito na literatura.⁴⁶ A reação mediada pela lipase de *C. rugosa* apresentou um baixo valor de conversão em relação as reações dos compostos **1** e **2** (27%) (– entrada 12), e também apresentou um baixo excesso enantiomérico dos enantiômeros (R)-**3a** e (S)-**3**, consequentemente um baixo coeficiente de enantiosseletividade. As reações de RCE do composto **3** mediadas pelas enzimas inéditas tiveram uma queda no tempo reacional e um aumento na conversão em relação as reações de RCE do composto **2**, evidenciando novamente a influência dos diferentes grupos substituintes na cinética da reação. A reação mediada pela lipase LipC6G9 alcançou 47% de conversão em apenas 24 horas reação sendo a lipase inédita com melhor conversão (TABELA 3 – entrada 14),

seguida pela LipC12 que alcançou 46% em 24 horas, esta última com baixo excesso enantiomérico para os enantiômeros (*S*)-**3** e (*R*)-**3a** (TABELA 3 – entrada 15).

Na sequência, as lipases CAL B, de *B. cepacia*, LipC6G9, LipC12 e a lipase de *C. rugosa*, foram avaliadas na reação resolução cinética enzimática do éster **1a** via reação de hidrólise.

TABELA 4 - REAÇÕES DE RCE DOS COMPOSTOS **1a-3a** MEDIADAS POR DIFERENTES LIPASES

<div style="text-align: center;">  </div>							
Entrada	Substrato	Lipase	Tempo (h)	C (%) ^a	ee(%) ^b		E ^c
					(<i>S</i>)-éster	(<i>R</i>)-álcool	
1	 (<i>S</i>)- 1a	CAL B	2	50	99	99	>200
2		<i>C. rugosa</i>	60	47	26	29	2,7
3		<i>B. cepacia</i>	216	29	40	99	>200
4		LipC6G9	120	26	34	99	>200
5		LipC12	48	49	89	85	46
6	 (<i>S</i>)- 2a	CAL B	24	50	99	99	>200
7		<i>C. rugosa</i>	24	60	38	25	2,3
8		<i>B. cepacia</i>	120	46	84	99	>200
9		LipC6G9	24	48	90	99	>200
10		LipC12	48	49	89	93	83
11	 (<i>S</i>)- 3a	CAL B	36	33	35	70	8
12		<i>C. rugosa</i>	36	30	6	15	1,4
13		<i>B. cepacia</i>	36	6	79	5	9
14		LipC6G9	36	33	33	65	7
15		LipC12	24	43	50	64	7

^aconversão: $c = 100 \times (ee_s/ee_s + ee_p)$; ^bexcesso enantiomérico: determinado por comparação das áreas observadas no cromatograma; ^cRazão enantiomérica: $E = \ln \{ [e.e. P (1 - e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \} / \ln \{ [e.e. P (1 + e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \}$.

A reação de hidrólise do éster **1a** mediada por CAL B apresentou conversão de 50% em 2 horas, altos valores de excesso enantiomérico para o éster (*S*)-**1a** e para o álcool (*R*)-**1**, e razão enantiomérica maior que 200 (TABELA 4 – entrada 1). As reações mediadas pelas enzimas inéditas apresentaram um acréscimo no tempo reacional e menores conversões em relação a reação de RCE do composto **1**. A

melhor conversão obtida foi da reação mediada pela lipase LipC12, que apresentou baixos excessos enantioméricos.

A reação de RCE do éster **2a**, correspondente ao álcool **2**, mediada por CAL B apresentou conversão de 50% em 24 horas, com altos valores de excesso enantiomérico para os enantiômeros (*S*)-**2a** e (*R*)-**2**, e razão enantiomérica maior que 200 (TABELA 4 – entrada 6). Mesmo utilizando a mesma quantidade enzima, 20 mg, as reações de e hidrólise **2a** mediadas pela CAL B tiveram um aumento significativo no tempo em relação ao composto sem substituição no anel aromático (**1a**). A reação mediada pela lipase de *C. rugosa* apresentou alta conversão em menos tempo que a reação do composto **1a** (TABELA 4 – entrada 7), mas mesmo assim apresentou um baixo excesso enantiomérico para os enantiômeros (*R*)-**2** e (*S*)-**2a**. As reações de RCE mediadas pelas enzimas inéditas apresentaram tempos de reação menores do que as reações com o composto **1a**, todas apresentaram conversões próximas a ideal, 50%, sendo a maior conversão obtida para a reação com a lipase LipC12, que foi a única que não obteve coeficiente enantiomérico maior que 200.

A reação de hidrólise do composto **3a** mediada por CAL B apresentou conversão de 33% em 36 horas, e obtendo um coeficiente enantiomérico considerado baixo E=8 (TABELA 4 – entrada 11), apesar de estar descrito na literatura que com 50 e 100 mg de enzima, em tolueno, é possível uma RCE completa desse éster em 72 horas.⁴⁵ A reação mediada pela lipase de *C. rugosa* apresentou uma conversão parecida com a da lipase CAL B, mas com baixo excesso enantiomérico para os produtos (*S*)-**3a** e (*R*)-**3** (TABELA 4 – entrada 12). Das reações mediadas pelas enzimas inéditas, a reação mediada pela lipase LipC12 foi a que apresentou a melhor conversão, mas assim como todas as outras enzimas, apresentou baixo excesso enantiomérico para os enantiômeros (*S*)-**3a** e (*R*)-**3** (TABELA 4 – entrada 15). O melhor coeficiente enantiomérico foi obtido na reação mediada pela lipase de *B. cepacia* E = 9 (TABELA 4 – entrada 13). Estes resultados evidenciam a influência da presença do grupo doador de densidade eletrônica como substituinte, de forma que é melhor tê-lo quando a molécula a ser resolvida atua como o nucleófilo e ataca o intermediário acil-enzima, que é o caso do álcool e não do éster.

As mudanças do coeficiente enantiomérico das lipases ao mediar as reações dos derivados do 1-feniletanol reforçam que o sítio catalítico das lipases pode apresentar peculiaridades dentre as lipases de diferentes origens. A CAL B apresentou alta seletividade frente aos derivados do 1-feniletanol como descrito na

literatura, exceto para a hidrólise do éster **3a**, e o tempo de reação aumentou consideravelmente com a presença de substituintes no anel aromático, sendo os maiores tempos para as reações de transesterificação do álcool **3**.

A lipase de *C. rugosa* não apresentou seletividade frente aos derivados do 1-feniletanol, que são considerados substratos pequenos em relação ao sítio ativo desta enzima, como apresentado no item 2.2.3.

A lipase de *B. cepacia* apresentou alta seletividade para todos os compostos, exceto para a hidrólise do éster **3a**, e obteve maior conversão para o álcool **1** nas reações de transesterificação e, do éster **2a** nas reações de hidrólise. A LipC6G9 foi a enzima não comercial que apresentou os melhores resultados, obteve alta seletividade para todos os compostos, exceto para a hidrólise do éster **3a**, e obteve maior conversão nas reações de transesterificação para o álcool **1**, e do álcool **3** em menos tempo que a CAL B. Nas reações de hidrólise a LipC6G9 obteve a melhor conversão para o éster **2a**, com mesmo tempo que a reação mediada pela CAL B. A LipC12 apresentou baixas conversões, mas alta seletividade, exceto para a hidrólise do éster **3a** em que obteve alta conversão e baixa seletividade, e para a hidrólise do éster **2a** em que obteve alta conversão e alta seletividade.

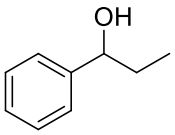
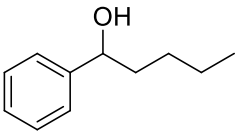
Diante dos resultados até aqui apresentados observou-se que as enzimas inéditas testadas são promissoras em reações de resolução cinética enzimática, de forma que foram aplicadas em reações de resolução cinética de álcoois secundários quirais estericamente impedidos.

5.3.2 Resolução cinética dos compostos **4-7** e **4a-7a**

Como apresentado no item 2.3, a pesquisa de novos biocatalisadores que atuem de forma eficiente em reações de resolução cinética enzimática de álcoois secundários estericamente impedidos é impulsionada pelo alto custo e a dificuldade na realização dos métodos químicos de resolução. Outro fator, é a procura por lipases que além de não seguir o modelo proposto por Kazlauskas e colaboradores sejam (*S*) seletivas. Neste trabalho, as lipases obtidas por metagenômica apresentaram ótimos resultados nas reações de resolução cinética dos compostos derivados do 1-feniletanol e são (*R*) seletivas. Na sequência todas as lipases foram avaliadas em reações de resolução cinética enzimática de álcoois estericamente impedidos.

O álcool **4** é o composto que possui um carbono a mais na cadeia alifática que 1-feniletanol (**1**), e não possui nenhuma substituição no anel aromático.

TABELA 5 - REAÇÕES DE RCE DOS COMPOSTOS **4-7** MEDIADAS POR DIFERENTES LIPASES

$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{R}_2 \\ (R,S)\text{-4-7} \end{array} \xrightarrow[\text{hexano, 35 } ^\circ\text{C}]{\text{lipase}} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{R}_2 \\ (S)\text{-4-7} \end{array} + \begin{array}{c} \text{OAc} \\ \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{R}_2 \\ (R)\text{-4a-7a} \end{array} $							
Entrada	Substrato	Lipase	Tempo (h)	C (%) ^a	ee(%) ^b		E ^c
					(S)-éster	(R)-álcool	
1	 (R, S)- 4	CAL B	36	50	99	99	>200
2		<i>C. rugosa</i>	48	15	57	9	4
3		<i>B. cepacia</i>	192	4	4	99	>200
4		LipC6G9	156	30	44	99	>200
5		LipC12	72	46	51	44	5
6	 (R, S)- 6	CAL B	216	43	75	99	>200
7		<i>C. rugosa</i>	216	13	78	12	9
8		<i>B. cepacia</i>	216	-	-	-	-
9		LipC6G9	192	10	10	99	>200
10		LipC12	216	9	10	99	>200

^aconversão: $c = 100 \times (ee_s/ee_s + ee_p)$; ^bexcesso enantiomérico: determinado por comparação das áreas observadas no cromatograma; ^cRazão enantiomérica: $E = \ln \{ [e.e. P (1 - e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \} / \ln \{ [e.e. P (1 + e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \}$.

A reação de transesterificação do álcool **4** mediada pela CAL B em hexano, apresentou a conversão ideal em 36 horas, com altos valores de excesso enantiomérico (TABELA 5 - entrada 1). Na literatura está descrito que em tolueno a CAL B apresentou 45% de conversão, um excesso enantiomérico de 94% para o éster formado e um coeficiente enantiomérico $E=75$.⁴⁵ A reação mediada pela lipase de *C. rugosa* apresentou além do baixo excesso enantiomérico (TABELA 5 - entrada 2), baixa conversão (15%) em relação aos obtidos para os derivados de 1-feniletanol. Das reações mediadas pelas lipases inéditas, a que apresentou melhor conversão foi a reação mediada por LipC12 (46% em 72 horas) (TABELA 5 - entrada 5), mas apresentou baixos excessos enantioméricos em relação as outras duas enzimas inéditas, que apesar do maior tempo de reação apresentaram excessos de 99% para o enantiômero (*R*)-**4a**.

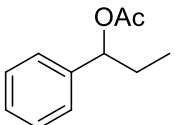
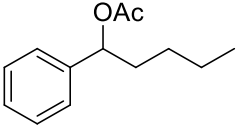
O álcool **6** é o composto sintetizado que possui o maior impedimento estérico, por possuir três carbonos a mais na cadeia alifática que os derivados de 1-feniletanol,

e não possui nenhuma substituição no anel aromático. A reação de transesterificação do álcool **6** mediada pela CAL B, apresentou conversão de 43% em 216 horas, com altos valores de excesso enantiomérico (TABELA 5 - entrada 6). Há relatos na literatura de que não houve reação de transesterificação do álcool **7** durante dez dias em éter isopropílico para a lipase CAL B.⁴⁹ A reação mediada pela enzima de *C. rugosa* em 216 horas obteve um baixo excesso enantiomérico e 13% de conversão em hexano (TABELA 5 - entrada 7).

A reação mediada por lipase de *B. cepacia* não aconteceu em 216 horas (TABELA 5 - entrada 8), mas há relatos na literatura de que a reação de transesterificação do álcool **6** mediada por lipase comercial de *B. cepacia* alcançou 47% de conversão e 88% de excesso enantiomérico em éter isopropílico durante 9 horas de reação; e alcançou 44% de conversão, com 92% de excesso enantiomérico, durante 11 horas de reação em éter etílico.⁴⁹ As reações mediadas pelas lipases LipC6G9 e LipC12 apresentaram alto excesso enantiomérico para o enantiômero (*R*)-**6** (99%) mas baixas conversões (10% e 9% respectivamente) (TABELA 5 - entrada 9 e 10 respectivamente).

Na sequência as cinco lipases foram avaliadas na reação de hidrólise dos ésteres **4a** e **6a**.

TABELA 6 – REAÇÕES DE RCE DOS COMPOSTOS **4a-7a** MEDIADAS POR DIFERENTES LIPASES

$ \begin{array}{c} \text{OAc} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{R}_2 \\ (R,S)\text{-4a-7a} \end{array} \xrightarrow[\text{lipase, hexano, 35 } ^\circ\text{C}]{\text{H}_2\text{O}} \begin{array}{c} \text{OAc} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{R}_2 \\ (S)\text{-4a-7a} \end{array} + \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{R}_2 \\ (R)\text{-4-7} \end{array} $							
Entrada	Substrato	Lipase	Tempo (h)	C (%) ^a	ee(%) ^b		E ^c
					(S)-éster	(R)-álcool	
1	 (R,S)- 4a	CAL B	216	43	75	99	>200
2		<i>C. rugosa</i>	216	32	26	53	10
3		<i>B. cepacia</i>	216	-	-	-	-
4		LipC6G9	192	10	10	99	>200
5		LipC12	216	9	10	99	>200
6	 (R,S)- 5a	CAL B	-	-	-	-	-
7		<i>C. rugosa</i>	-	-	-	-	-
8		<i>B. cepacia</i>	-	-	-	-	-
9		LipC6G9	-	-	-	-	-
10		LipC12	-	-	-	-	-

^aconversão: $c = 100 \times (ee_s/ee_s + ee_p)$; ^bexcesso enantiomérico: determinado por comparação das áreas observadas no cromatograma; ^cRazão enantiomérica: $E = \ln \{ [e.e. P (1 - e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \} / \ln \{ [e.e. P (1 + e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \}$.

A reação de hidrólise do éster **4a** mediada pela CAL B, apresentou a conversão de 43% em 216 horas, com 99% de excesso enantiomérico para o álcool (R)-**4** (TABELA 6 - entrada 1), apesar da alta enantiosseletividade, o tempo reacional aumentou consideravelmente em relação aos ésteres menos estericamente impedidos e também em relação a reação de RCE de transesterificação do álcool **4**. A lipase de *C. rugosa* em 48 horas alcançou 85% de conversão, mais do que a conversão ideal, mas com baixo excesso enantiomérico para os enantiômeros (S)-**4a** e (R)-**4** (TABELA 6 - entrada 2). A lipase LipC6G9 em 192 horas alcançou 10% de conversão e alto excesso enantiomérico (TABELA 6 - entrada 4), a maior conversão e o menor tempo de reação das enzimas inéditas. A lipase LipC12 em 216 horas alcançou 9% de conversão, também com altos excessos enantioméricos (TABELA 6 - entrada 5). Não houve reação para a lipase de *B. cepacia* (TABELA 6 - entrada 3).

As reações de resolução cinética enzimática mediadas pelas lipases CAL B, de *C. rugosa*, de *B. cepacia*, LipC6G9 e LipC12 do composto **6a** não aconteceram

durante as 216 horas observadas (TABELA 6 - entradas 6-10). Os resultados obtidos para a transesterificação do álcool **6** e para a hidrólise do éster **6a**, reforçam a literatura que além de substituições no anel aromático, o tamanho da cadeia carbônica alifática também influencia na seletividade das enzimas. Conforme aumentou o tamanho da cadeia carbônica a conversão e a enantiosseletividade das enzimas inéditas diminuíram, ou as reações não aconteceram como no caso da hidrólise do éster **6a**.

A influência do meio reacional sobre a atividade enzimática, incluindo a enantiosseletividade, é uma característica bastante conhecida em reações biocatalisadas. A escolha dos solventes é baseada na sua capacidade de solubilizar os componentes da reação e ainda em seus respectivos log P, que é um parâmetro físico-químico fortemente influenciado pela polaridade, e que pode provocar a desnaturação da enzima. Esta influência pode ser notada na comparação com dados da literatura,⁴⁷ onde hidrólise do éster **3a** mediada pela CAL B, que em tolueno se mostrou mais seletiva do que em hexano (TABELA 4 - entrada 1); já na transesterificação do álcool **4** a utilização do tolueno⁴⁸ diminuiu a seletividade da reação em relação ao hexano aqui utilizado (TABELA 5 - entrada 1).

A transesterificação do álcool **6** mediada pela CAL B em hexano alcançou uma conversão de 43% (TABELA 5 - entrada 1), enquanto que foi relatado que em éter isopropílico não acontece.⁴⁹ A transesterificação mediada pela lipase de *B. cepacia* em hexano (TABELA 5 - entrada 2) apresentou uma baixa conversão mesmo em um longo período de reação, enquanto que na literatura,⁴⁹ em éter isopropílico e éter etílico alcançou conversões quase ideais em menores tempos de reação.

Outro fator experimental relevante para a atividade enzimática foi a temperatura, diferentes reações catalisadas pela mesma enzima geralmente possuem diferentes energias de ativação e a seletividade enzimática pode depender da temperatura.⁵¹ Na reação de transesterificação do álcool **2** mediada pela CAL B, utilizou-se uma temperatura de 35 °C diminuindo em uma hora o tempo encontrado na literatura,⁴⁶ quando foi empregado 30 °C.

Diante dos resultados apresentados observou-se que as enzimas inéditas testadas são promissoras em reações de resolução cinética enzimática, porém para o emprego comercial se mostra necessário a otimização de parâmetros reacionais como temperatura, solvente e quantidade de enzima utilizada, para a diminuição do tempo de reação e aumento da seletividade frente a alguns substratos.

6 CONCLUSÕES

Foram sintetizados e caracterizados sete álcoois racêmicos e seus acetatos correspondentes, já descritos na literatura, por metodologias químicas conhecidas e também descritas para estes compostos.

Foram selecionadas cinco lipases, duas comerciais do laboratório de Síntese Química e Enzimática e, três dentre as disponíveis no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise, que são inéditas na resolução cinética de racematos. Duas das enzimas inéditas, LipC6G9 e LipC12, foram obtidas por uma técnica nova chamada metagenômica, e lipases obtidas por essa técnica ainda não foram descritas na literatura na utilização em biotransformações de compostos orgânicos, como resolução cinética de racematos.

As cinco lipases foram testadas em reações de transesterificação dos álcoois e reações de hidrólise dos seus ésteres correspondentes. Os resultados obtidos até agora nas reações de resolução cinética mediadas pelas enzimas inéditas são promissores, pois demonstram que elas podem ser utilizadas na biotransformação de compostos orgânicos, e mesmo não sendo enzimas modificadas geneticamente, as lipases inéditas obtiveram conversão e seletividade comparáveis as das enzimas comerciais, mesmo sem otimização de parâmetros reacionais.

7 REFERÊNCIAS

- ¹ FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**. 6 ed, p. 17. Springer. Berlin, 2011.
- ² KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.; BARON, A. M.; LIMA, V. M.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 279-286, 2004.
- ³ VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 515-536, 2007.
- ⁴ BIOCHEMICAL NOMENCLATURE COMMITTEES. Disponível em : <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/>>. Acesso em 09 de abril de 2014.
- ⁵IUBMB Enzyme Nomenclature - EC 3.1.1.3. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/1/1/3.html>>. Acesso em: 09 de abril de 2014.
- ⁶ POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 215-226, 2001.
- ⁷ BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 73-81, 2002.
- ⁸ UPPENBERG, J.; PATKAR, S.; BERGFORS, T. Crystallization and preliminary X-Ray studies of Lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, p. 790-792, 1994.
- ⁹ SARDA, L. E.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, p. 513- 521, 1958.
- ¹⁰ JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.
- ¹¹ JAEGER, K.; REETZ, M. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

¹²MATTHEWS, B. W., SIGLER, P. B., HENDERSON, R. BLOW, D. M. Three-dimensional structure of Tosyl- α -chymotrypsin. **Nature**, v. 214, p.652-656, 1967.

¹³ BLOW, D. M. The Study of α -Chymotrypsin by X-Ray Diffraction. **Biochem. J.**, v. 112, p. 261-268, 1969.

¹⁴ JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 14, p. 29-63, 1994.

¹⁵ VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 515-536, 2007.

¹⁶ SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, A.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, p. 258-268, 2001.

¹⁷ ANTHONSEN, T. Reactions catalysed by enzymes. In: STRAATHOF, A. J. J. ADLERCREUTZ, P. **Applied biocatalysis**. 2.ed. British: Harwood Academic Publishers, 2005. cap.1, p.13-17.

¹⁸ ROGALSKA, E.; RANSAC, S.; VERGER, S. Stereoselectivity of lipases II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 20271-20276, 1990.

¹⁹ SHRAG, J. D.; CYGLER, M. Lipases and α/β hydrolases fold. **Methods Enzymology**, v. 284, p. 85-107, 1997.

²⁰ GHANEM, A.; ABOUL-ENEINB, H. Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 3331–3351, 2004.

²¹ HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

²² GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.64, p. 763-781, 2004.

-
- ²³ MURALIDHAR, R. V.; CHIRUMAMILLA, R. R.; MARCHANT, R.; RAMACHANDRAN, V. N.; WARD, O. P.; NIGAM, P. Understanding lipase stereoselectivity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 81–97, 2002.
- ²⁴ HANDELSMAN, J.; RONDON, S. F.; BRADY, J.; CLARDY, R. M. Molecular biology provides access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology** v. 5, p. 245-249, 1998.
- ²⁵ SOLIMAN, N. A.; KNOLL, M.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SCHMID, R. D.; LANGE, S. Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. **Process Biochemistry**, v.42, p. 1090–1100, 2007.
- ²⁶ CHOW, J.; KOVACIC, F.; DALL ANTONIA, Y.; KRAUSS, U.; FERSINI, F.; SCHMEISSER, C.; LAUINGER, B.; BONGEN, P.; PIETRUSZKA, J.; SCHMIDT, M.; MENYES, I.; BORNSCHEUER, U. T.; ECKSTEIN, M.; THUM, O.; LIESE, A.; MUELLER-DIECKMANN, J.; JAEGER, K. E.; STREIT, W. R. The Metagenome-Derived Enzymes LipS and LipT Increase the Diversity of Known Lipases. **PLOS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47665, 2012.
- ²⁷ LEE, M. H.; OH, K. H.; KANG, C. H.; KIM, J. H.; OH, T. K.; RYU, C. M.; YOON, J. H. Novel Metagenome-Derived, Cold-Adapted Alkaline Phospholipase with Superior Lipase Activity as an Intermediate between Phospholipase and Lipase. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 14, p. 4959-4966, 2012.
- ²⁸ CORREIA, V. A. B. **Seleção e Caracterização Molecular de uma Lipase de Metagenômica de Solo de Cerrado**. Brasília, 2010, p. 49 (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Universidade Católica de Brasília.
- ²⁹ ABATE, A.; BRENNAN, E.; FUGANTI, C.; GATTI, F.; SERRA, F. Lipase-catalysed preparation of enantiomerically enriched odorants. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 32, p. 33-51, 2004.
- ³⁰ TEMBA, E. S. C.; OLIVEIRA, I. M. F.; DONNICI, C. L. Álcoois quirais: métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 112-122, 2003.
- ³¹ KAZLAUSKAS, R. J.; WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. A rule to predict wich enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions

catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 2656-2665, 1991.

³² GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, p. 1721–1754. 2007.

³³ LAVANDERA, I.; KERN, A.; SILVA, B. F.; GLIEDER, A.; WILDEMAN, S. de. KROUTIL, W. Stereoselective Bio-reduction of Bulky-Bulky Ketones by a Novel ADH from *Ralstonia* sp. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, p. 6003-6005. 2008.

³⁴ AMAREGO, W. L. F.; CHAI, C. L. L.; **Purification of Laboratory Chemicals**, 5 ed.; Elsevier Science: USA, 2006.

³⁵ GLOGAUER, A.; MARTINI, V. P.; FAORO, H.; COUTO, G. H.; MÜLLER-SANTOS, M.; MONTEIRO, R. A.; MITCHELL, D. A.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; KRIEGER, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbial Cell Factories**, 2011.

³⁶ SALUM, T. F. C.; BARON, A. M.; ZAGO E.; TURRA, V.; BARATTI, J., D. A.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. *Biocatalysis and Biotransformation*. v. 26, p. 197-203, 2008.

³⁷ GONÇALVES, A. P. V. **Imobilização de uma cutinase recombinada no zeólito NaY: estudos cinéticos e de estabilidade**. Lisboa, 1999, p.246f. Tese de Doutorado. Programa de pós-graduação em biotecnologia. Universidade Técnica de Lisboa.

³⁸ LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free acids. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

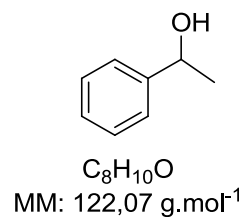
³⁹ OVERMEYER, A.; S. SCHRADER-LIPPELT; V. KASCHE; G. BRUNNER. Lipase-catalysed kinetic resolution of racemates at temperatures from 40 °C to 160 °C in supercritical CO₂. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 1, p. 65-69, 1999.

⁴⁰ ALMEIDA, R. V.; BRANCO, R.V.; PEIXOTO, B., LIMA, C. S.; ALQUERES, S. M. C.; MARTINS, O .B.; ANTUNES, O. A.C.; FREIRE, D. M.G. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 531-537, 2008.

-
- ⁴¹ HOFFMANN, I.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. G. Enantioselective Resolution of (R,S)-1-Phenylethanol Catalyzed by Lipases Immobilized in Starch Films. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1559-1567, 2011.
- ⁴² CHEN, C.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, J. Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolution of Enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 7294-7299, 1982.
- ⁴³ GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, p. 1721–1754, 2007.
- ⁴⁴ GONÇALVES, A. P. V. **Imobilização de uma cutinase recombinada no zeólito NaY: estudos cinéticos e de estabilidade**. Lisboa, 1999, p.246f. Tese de Doutorado. Programa de pós-graduação em biotecnologia. Universidade Técnica de Lisboa.
- ⁴⁵ FRYKMAN, H.; OHRNER, N.; NORIN, T.; HULT, K. S-ethyl thiooctanoate as acyl donor in lipase catalysed resolution of secondary alcohols. **Tetrahedron letters**, v.34, n.8, p. 1367-1370, 1993.
- ⁴⁶ WANG, B.; JIANG, L.; WANG, J.; MA, J.; LIU, M.; YU, H. A tandem and fully enzymatic procedure for the green resolution of chiral alcohols: acylation and deacylation in non-aqueous media. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 22, p. 980–985, 2011.
- ⁴⁷ MERABET-KHELASSI, M.; HOUÏENE, Z.; ARIBI-ZOUIOUECHE, L.; RIAÏT, O. Green methodology for enzymatic hydrolysis of acetates in non-aqueous media via carbonate salts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 23, p. 828–833, 2012.
- ⁴⁸ CÓRDOVA, A.; TREMBLAY, M. R.; CLAPHAM, B.; JANDA, K. D. A Sequential application of kinetic resolution and Polymer-Supported scavenging for the isolation of Chiral Secondary Alcohols. **J. Org. Chem.**, v. 66, p. 5645-5648, 2001.
- ⁴⁹ EMA, T.; URA, N.; YOSHII, M.; KORENAGA, T.; SAKAI, T. Empirical method for predicting enantioselectivity in catalytic reactions: demonstration with lipase and oxazaborolidine. **Tetrahedron**, v. 65, p. 9583–9591, 2009.
- ⁵⁰ DHAKE, K. P.; DESHMUKH, K. M.; WAGH, Y. S.; SINGHAL, R. S.; AND BHANAGE, B. M. Investigation of steapsin lipase for kinetic resolution of secondary alcohols and synthesis of valuable acetates in non-aqueous reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 15-23, 2012.

⁵¹ PERSSON, M.; COSTES, D.; WEHTJE, E. ADLERCREUTZ, P. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrilelyase enantioselectivity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 916-923, 2002.

ANEXOS



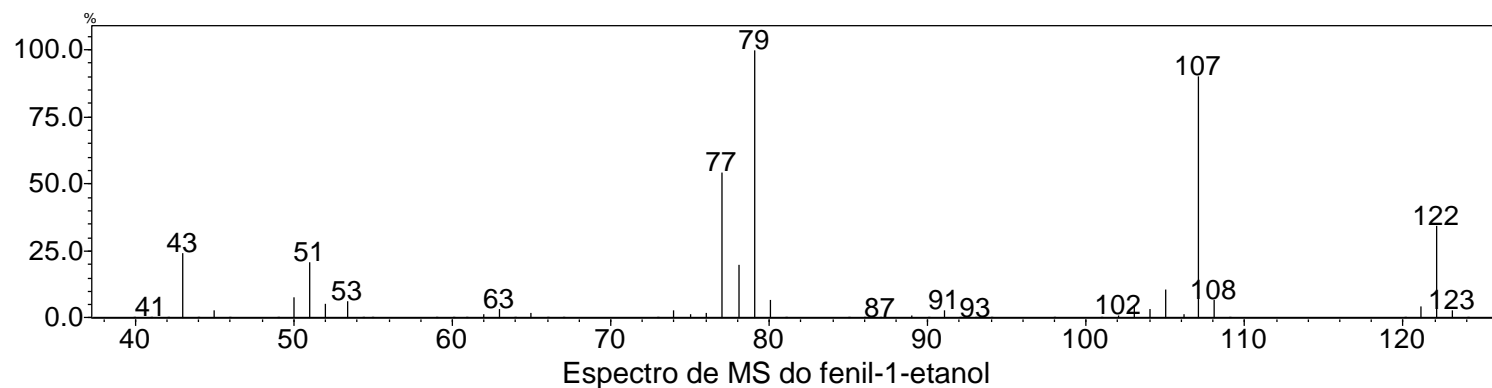
1-feniletanol (**1**) Rendimento: 80%.

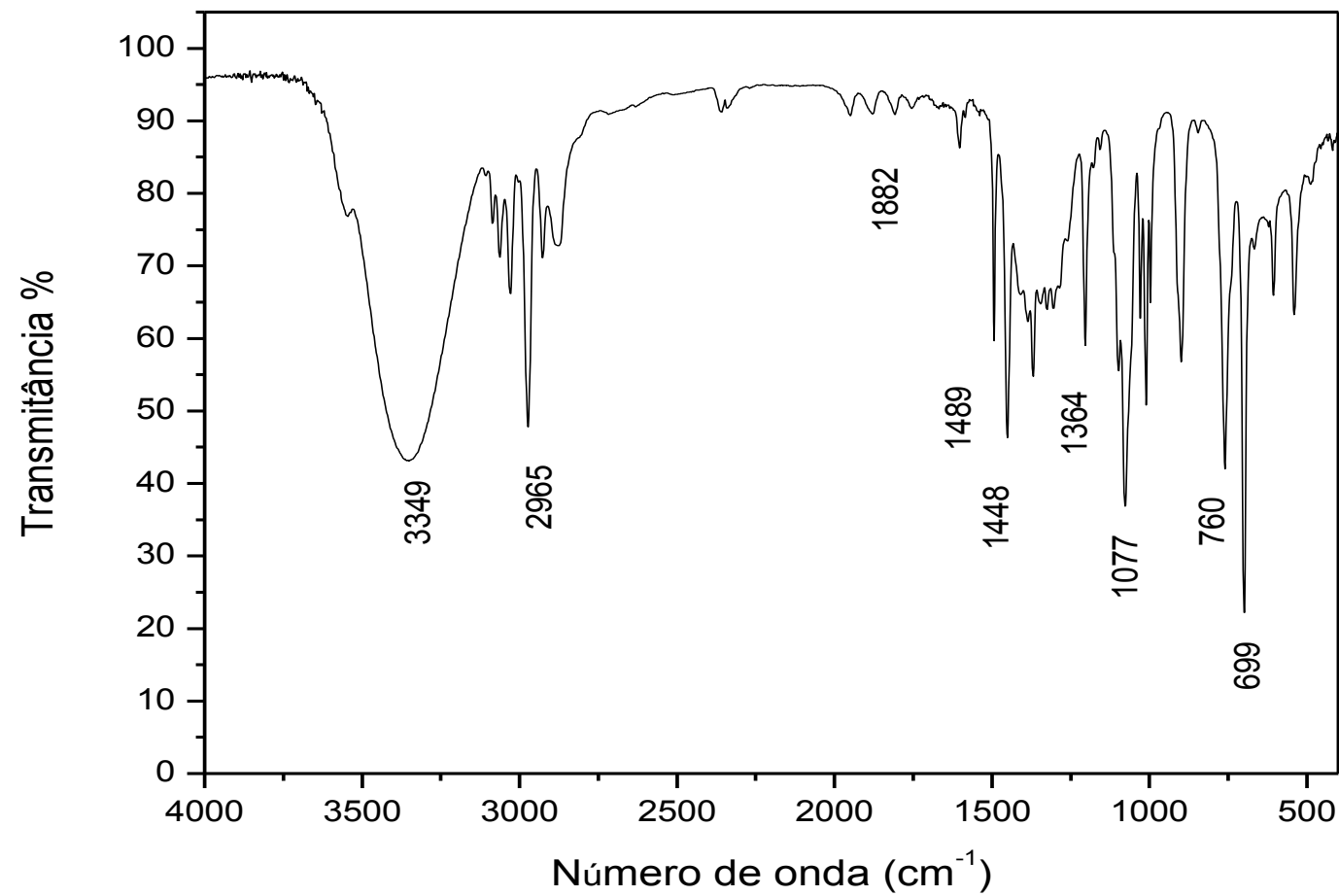
CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 122 (M^+ , 34%); 107 (90%); 79 (100%); 77(54%); 51 (21%); 43 (24%).

IV (cm^{-1}): 3349, 2965, 1882, 1489, 1448, 1384, 1077, 760, 699.

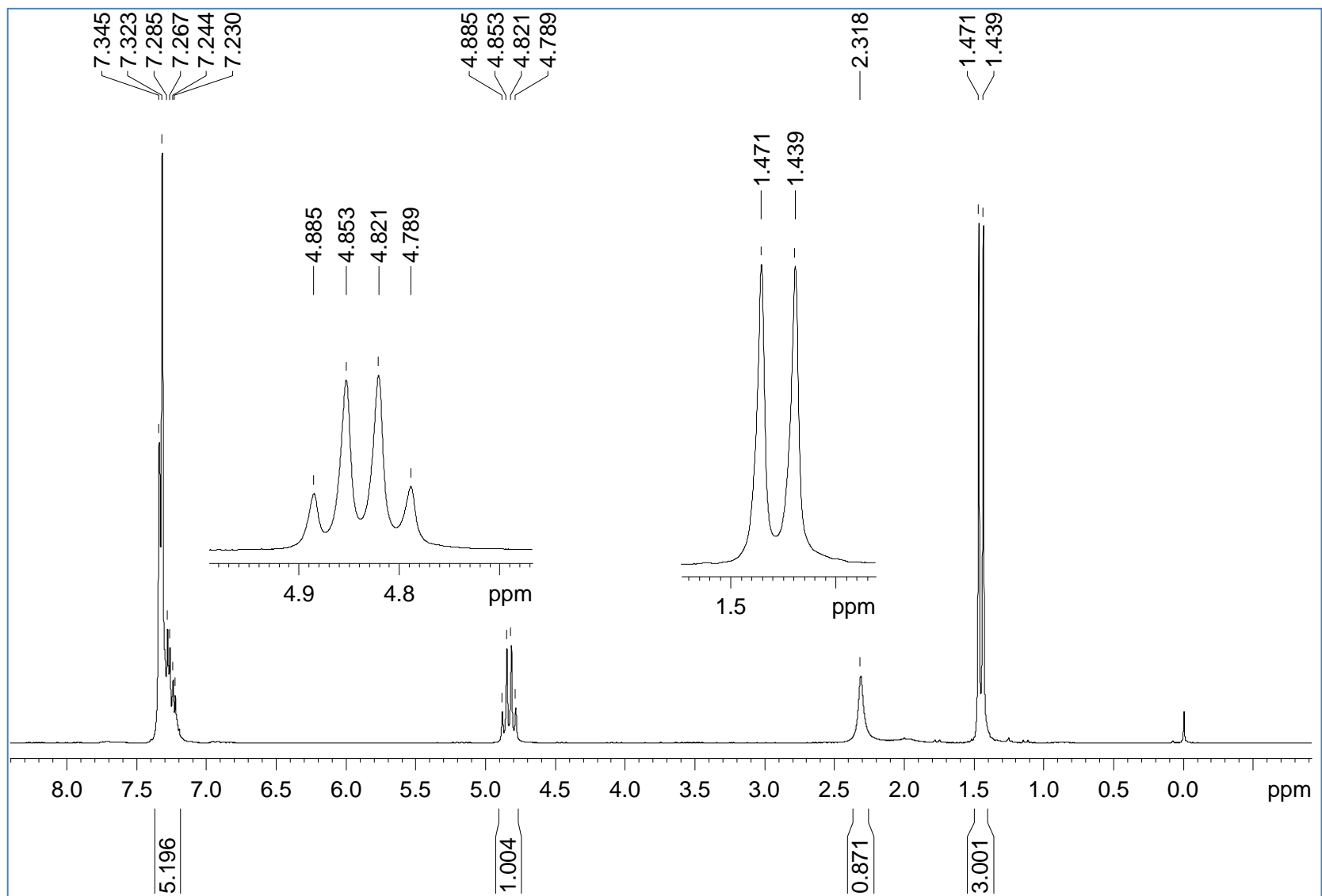
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 1,5 (d, J = 6,6 Hz, 3H); 2,30 (s largo, 1H); 4,83 (q, J = 6,4 Hz, 1H); 7,29 (m, 5H).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 25,1; 70,3; 125,4; 127,4; 128,4; 145,8.

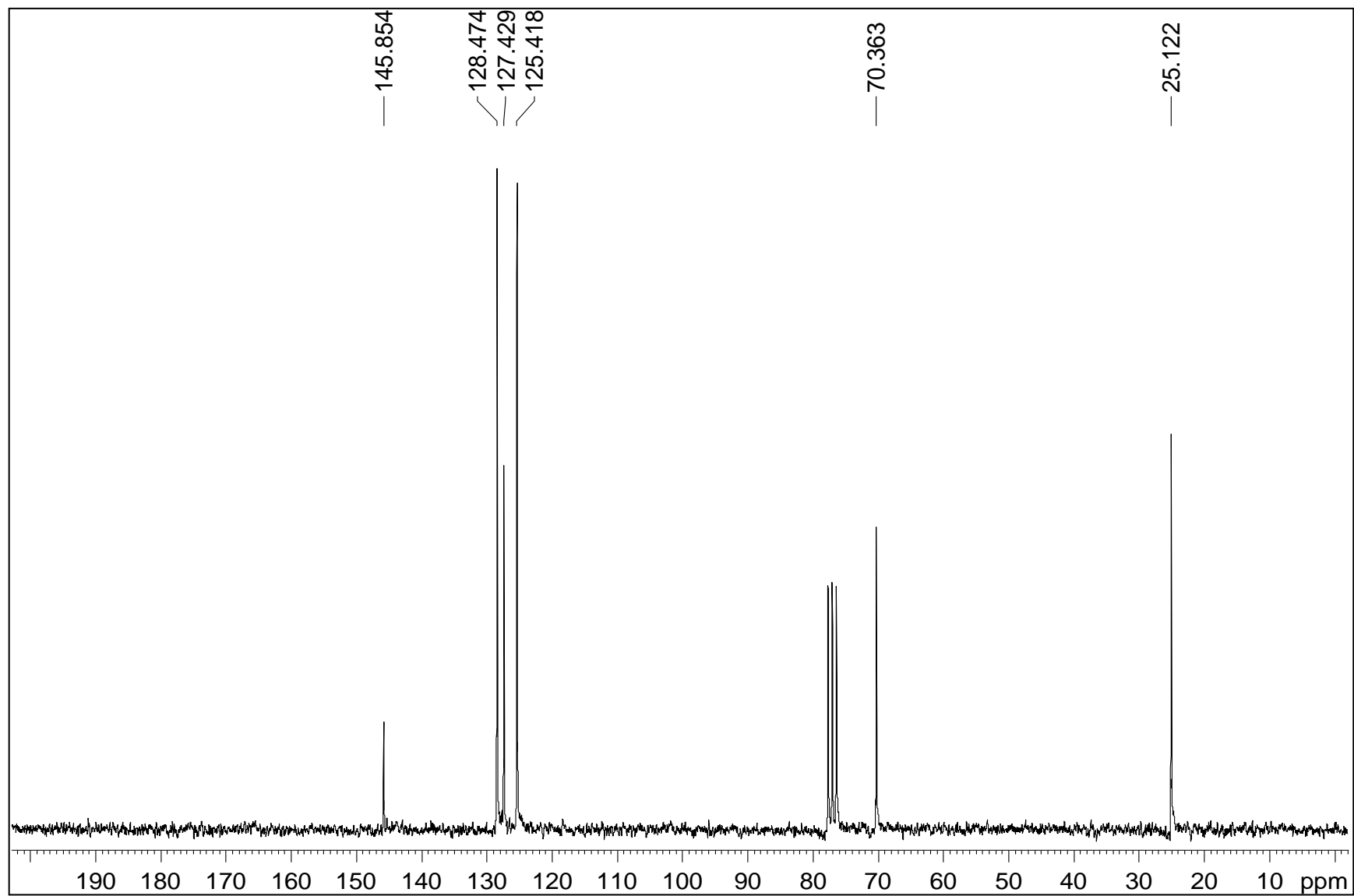




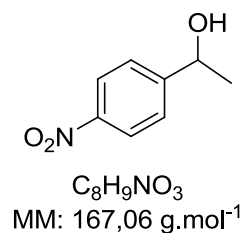
Espectro de FTIR do fenil-1-etanol



Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) do fenil-1-etanol.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do fenil-1-etanol.



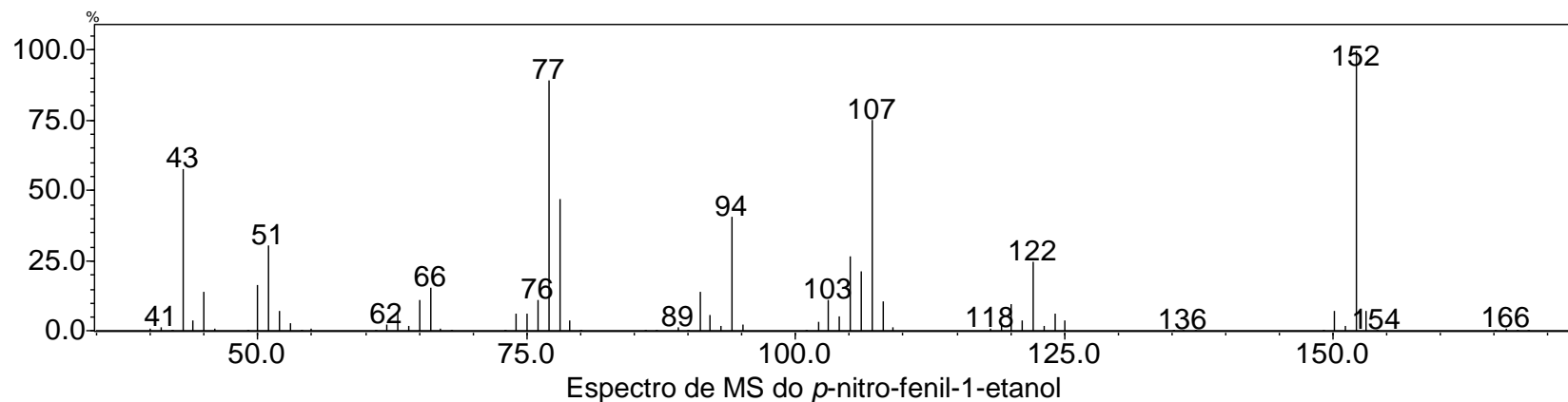
p-nitro-1-feniletanol (**2**) Rendimento: 90%.

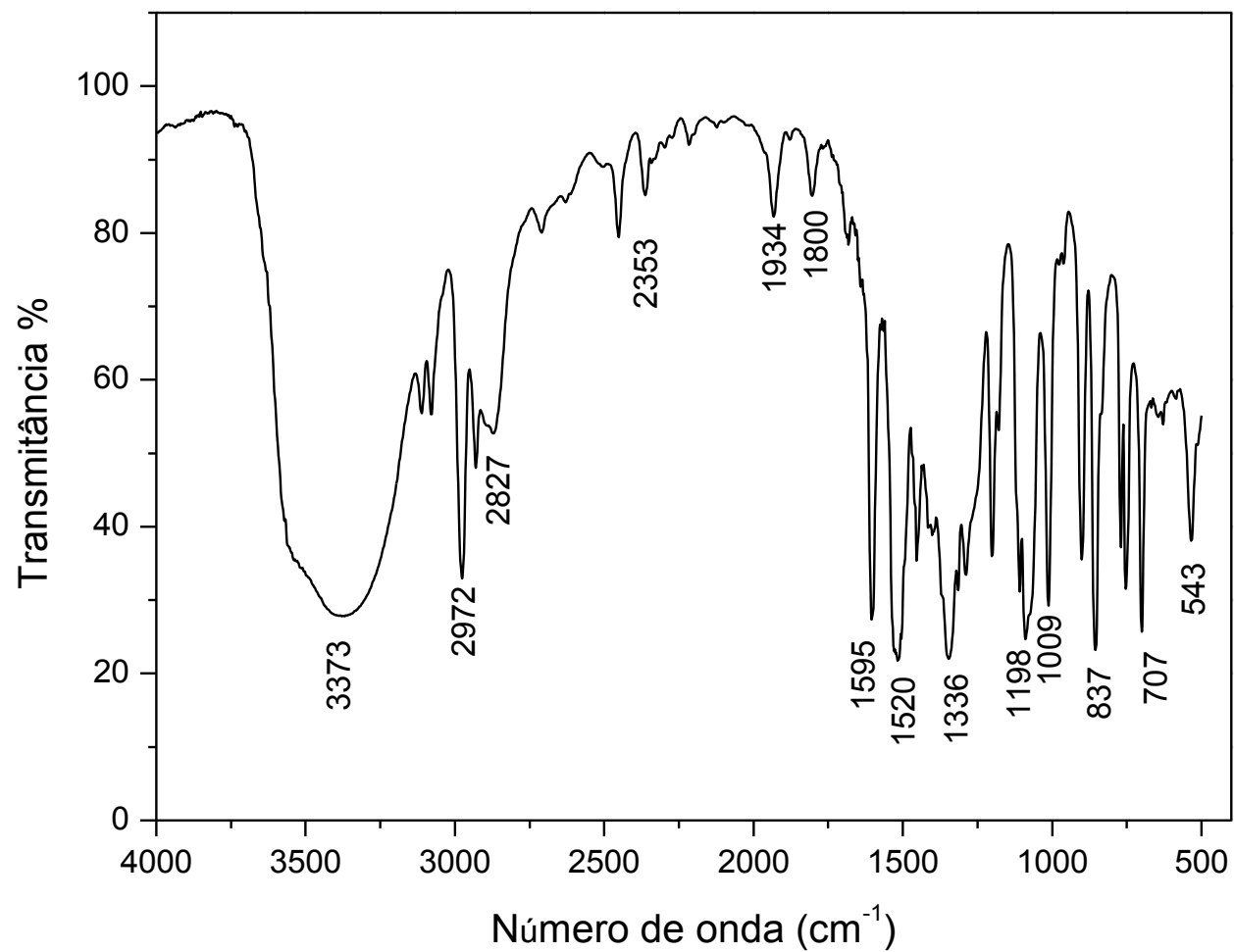
CG-EM (70 eV), *m/z* (intensidade relativa): 166 (*M*⁺, 1%); 152 (100%); 122 (25%); 107 (75%); 94 (41%); 77 (89%); 51 (30%); 43 (58%).

IV (cm⁻¹): 3373, 2972, 2827, 2353, 1934, 1800, 1595, 1336, 1098, 1009, 837, 707, 543.

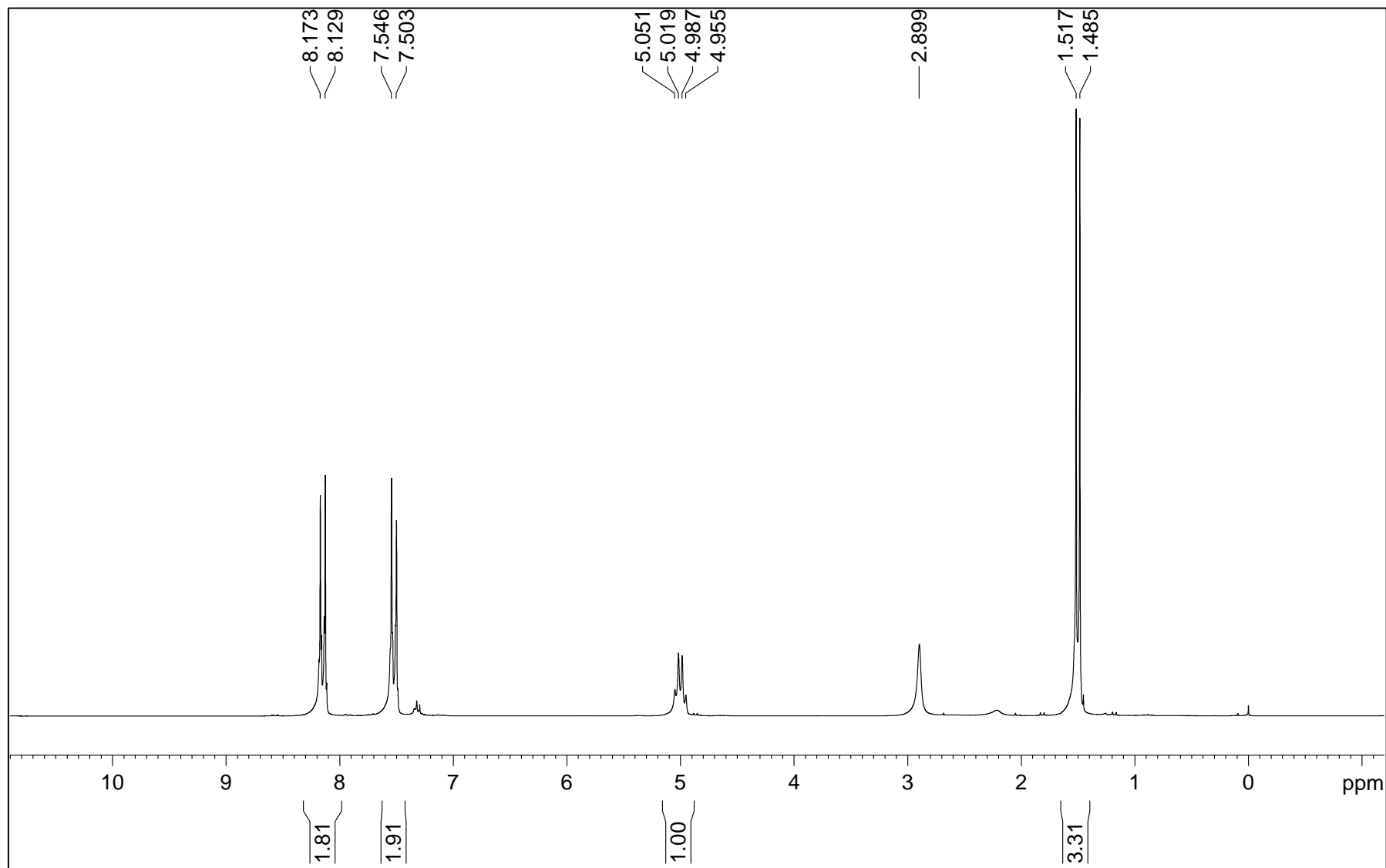
RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,49 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); 2,85 (s, 3H); 5,00 (q, *J* = 6,5 Hz, 1H); 7,52 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 8,14 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 25,3; 22,2; 71,2; 123,8; 126,7; 147,4; 148,9; 170,0.

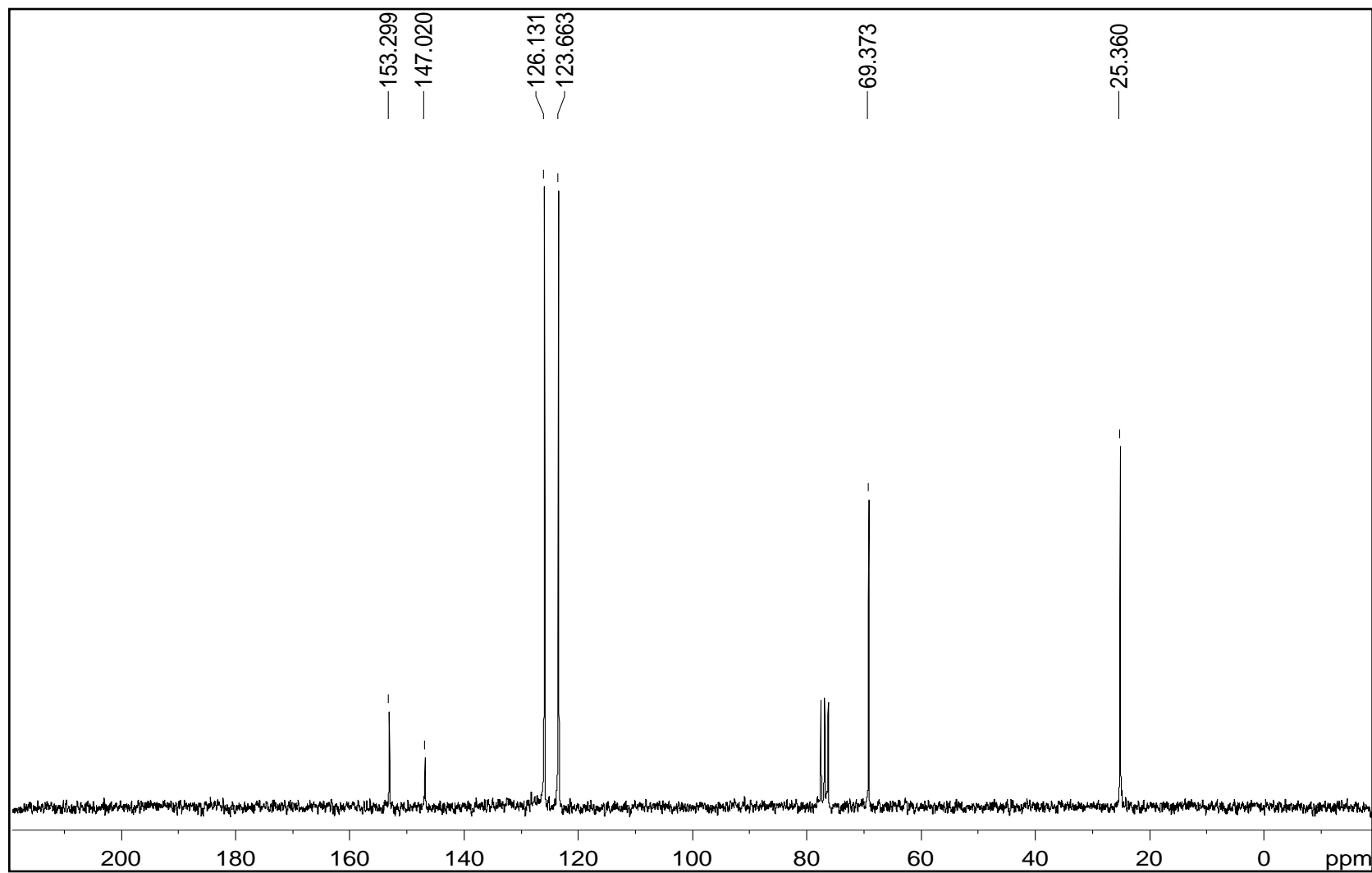




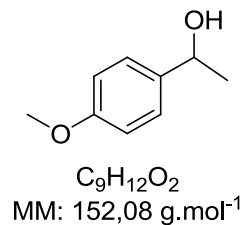
Espectro de FTIR do *p*-nitro-fenil-1-etanol



Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) do *p*-nitro-fenil-1-etanol.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do *p*-nitro-fenil-1-etanol.



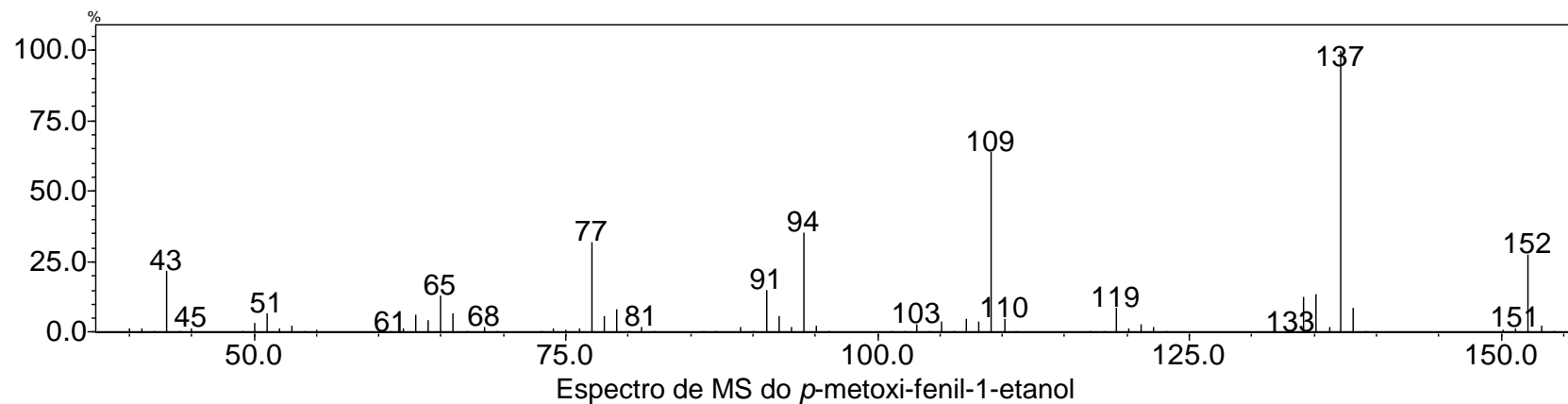
p-metoxi-1-feniletanol (**3**) Rendimento: 82%.

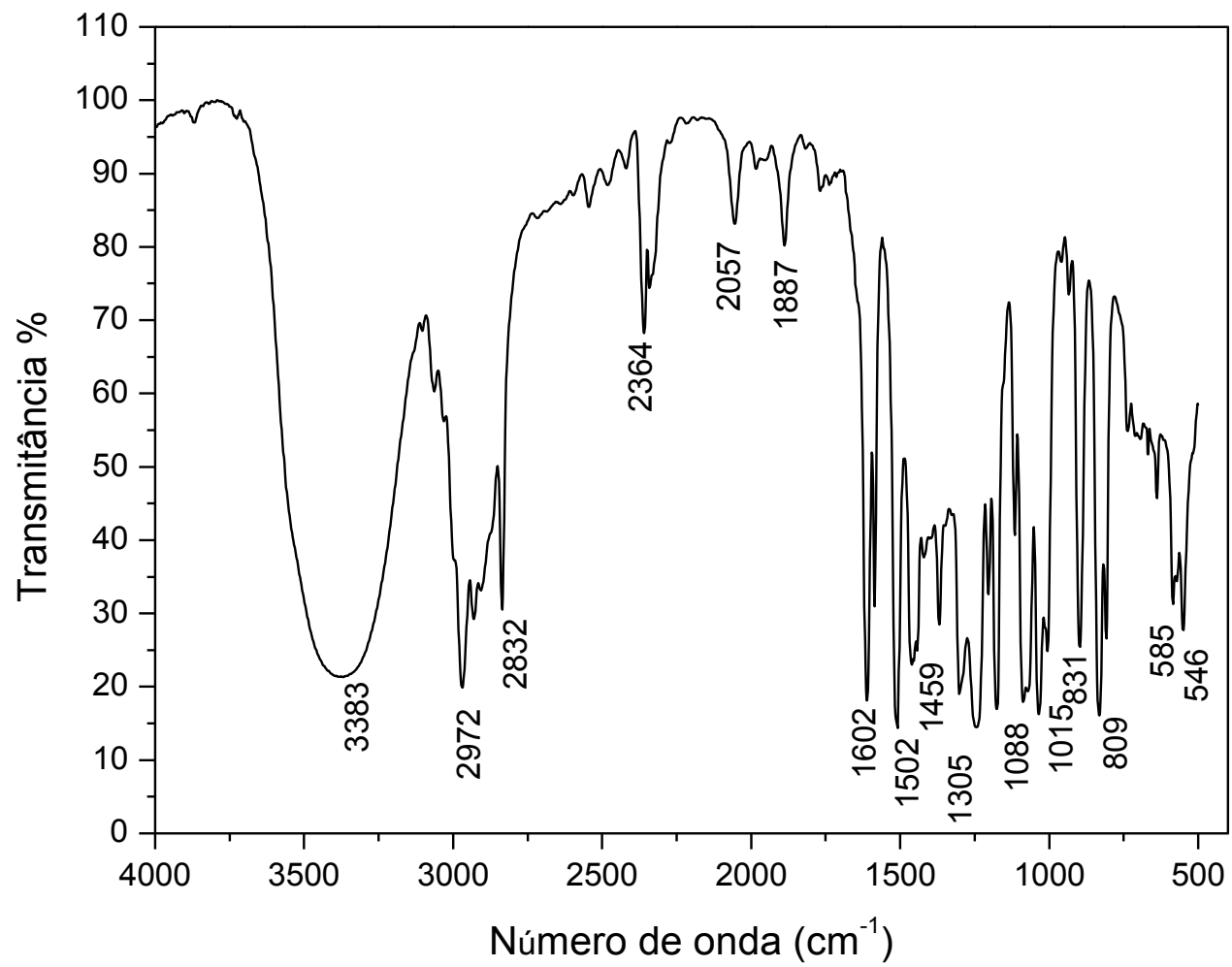
CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 152 (M^+ , 30%); 137 (100%); 109 (64%); 94 (35%); 77(32%); 43 (21%).

IV (cm^{-1}): 3383, 2972, 2832, 2364, 2057, 1887, 1602, 1502, 1459, 1305, 1088, 831, 809, 585, 546.

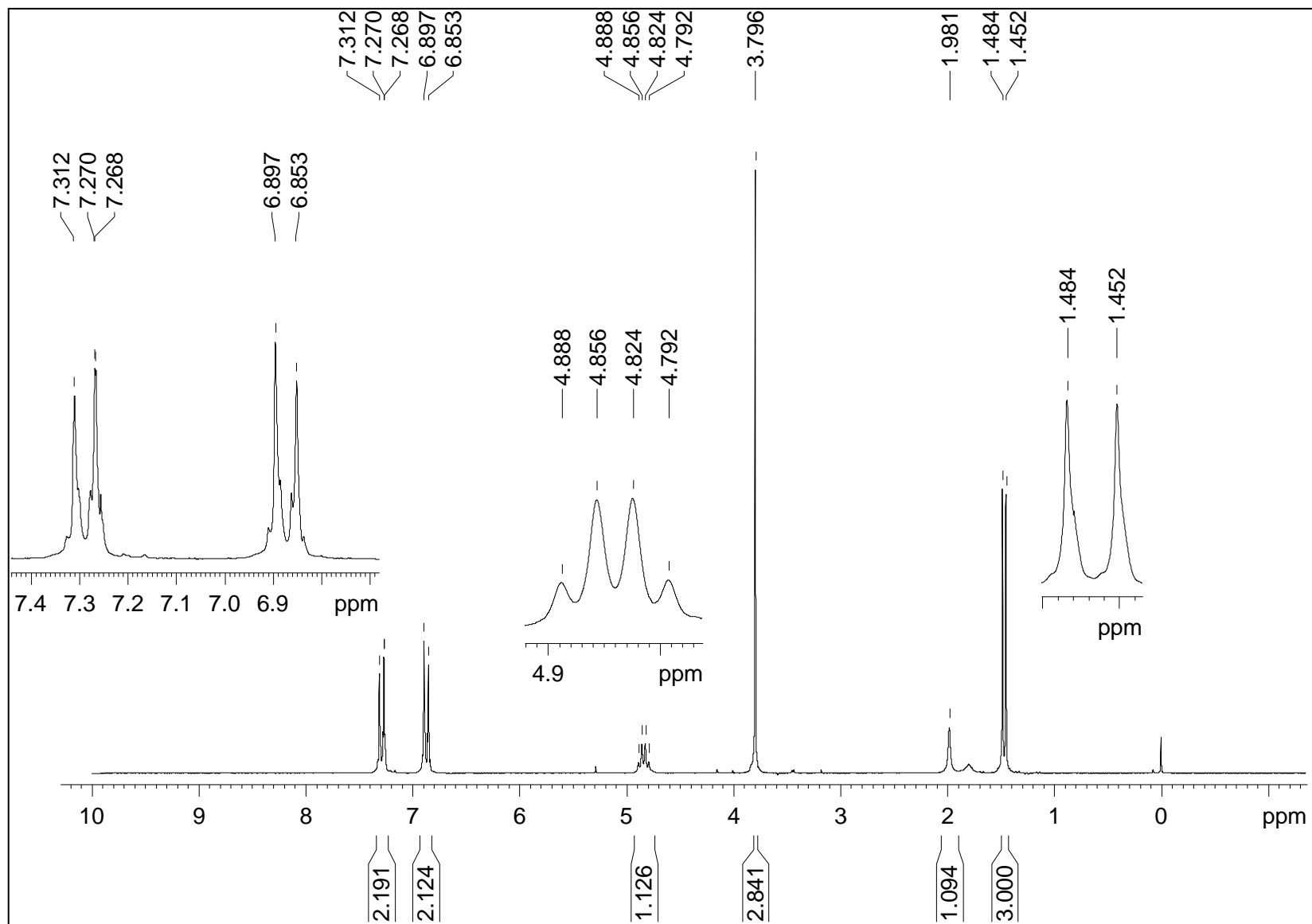
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 1,46 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H); 4,84 (q, $J = 6,3$ Hz, 1H); 6,87 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 7,28 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 24,9; 55,2; 69,9; 113,8; 126,6; 138,0; 158,9.

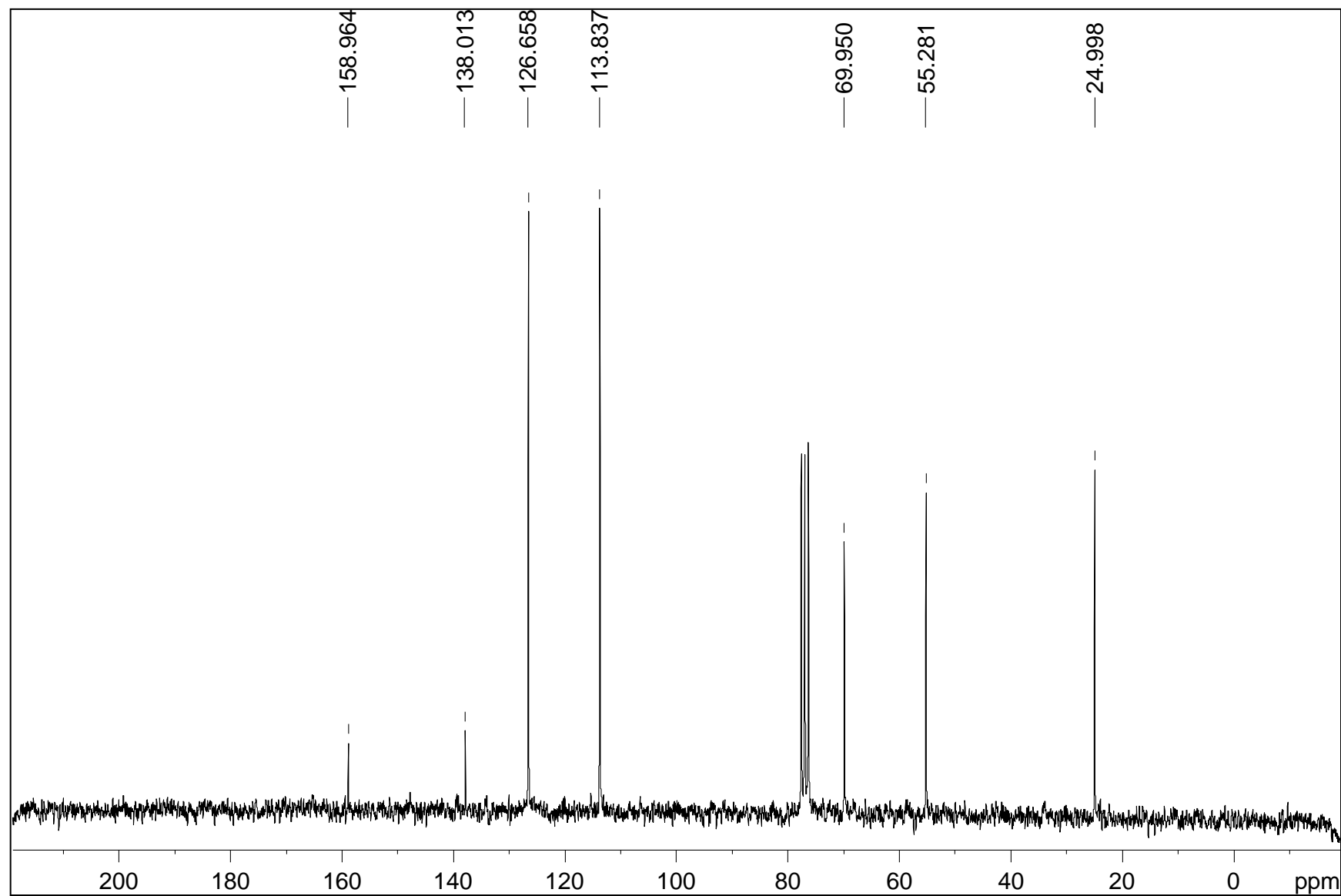




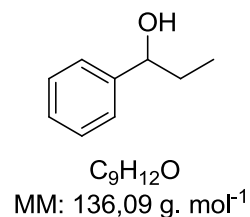
Espectro de FTIR do *p*-metoxi-fenil-1-etanol.



Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) do *p*-metoxi-fenil-1-etanol.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do *p*-metoxi-fenil-1-etanol.



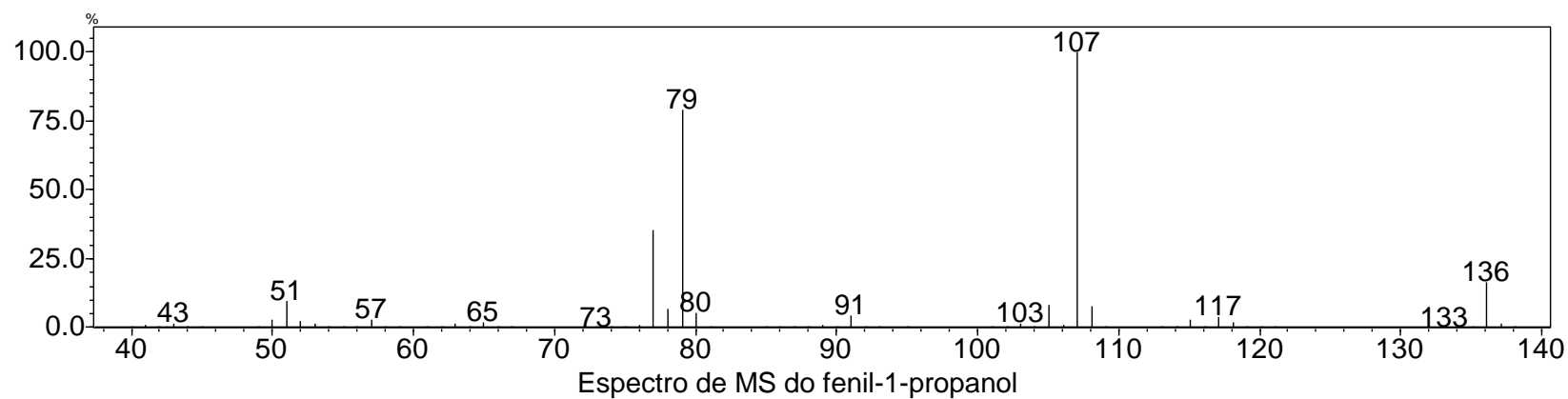
1-fenilpropanol (**4**) Rendimento: 80%.

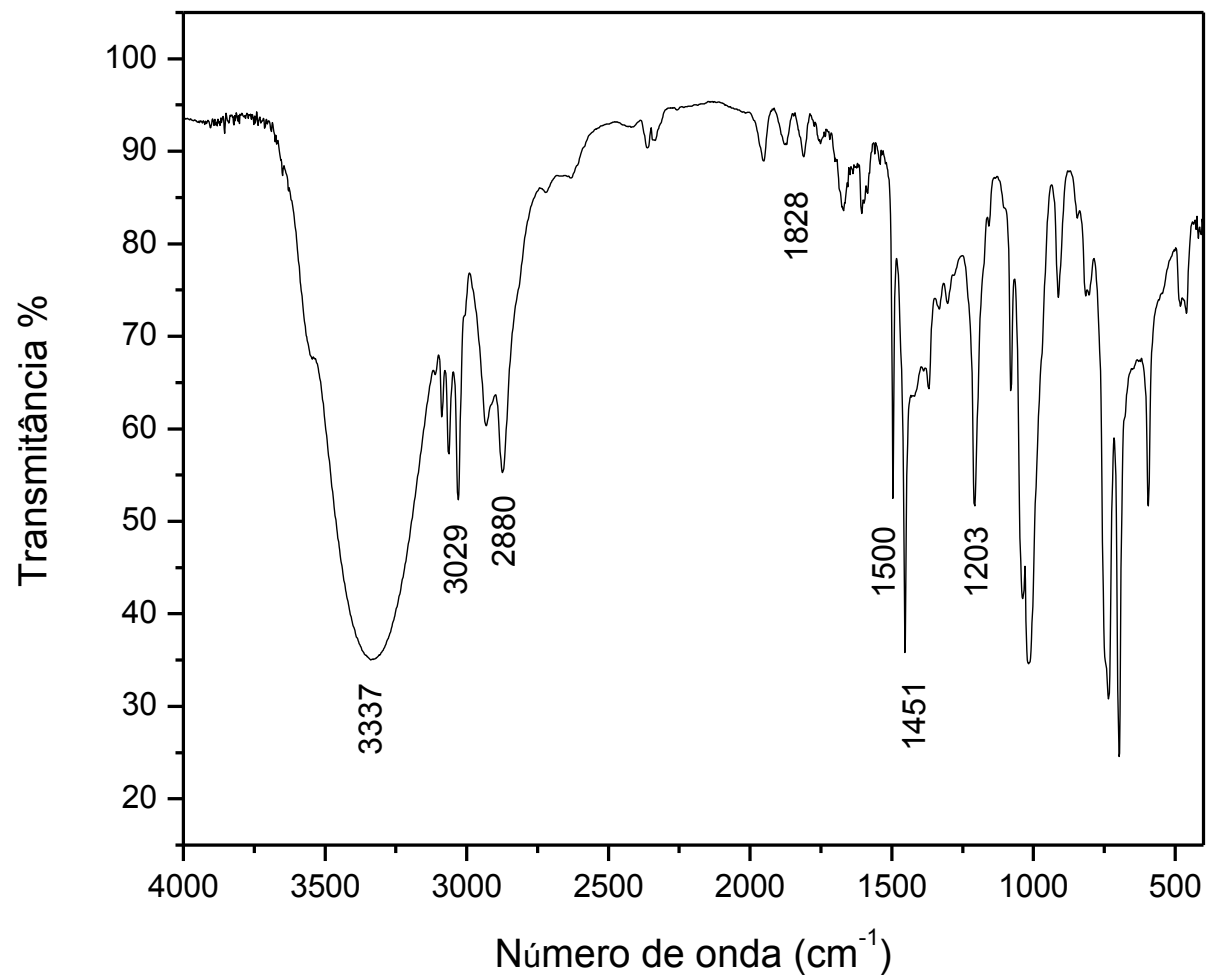
CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 136 (M^+ , 17%); 107 (100%); 91 (5%); 79 (79%); 77 (35%); 51 (10%).

IV (cm^{-1}): 3337, 3029, 2880, 1828, 1500, 1451, 1203.

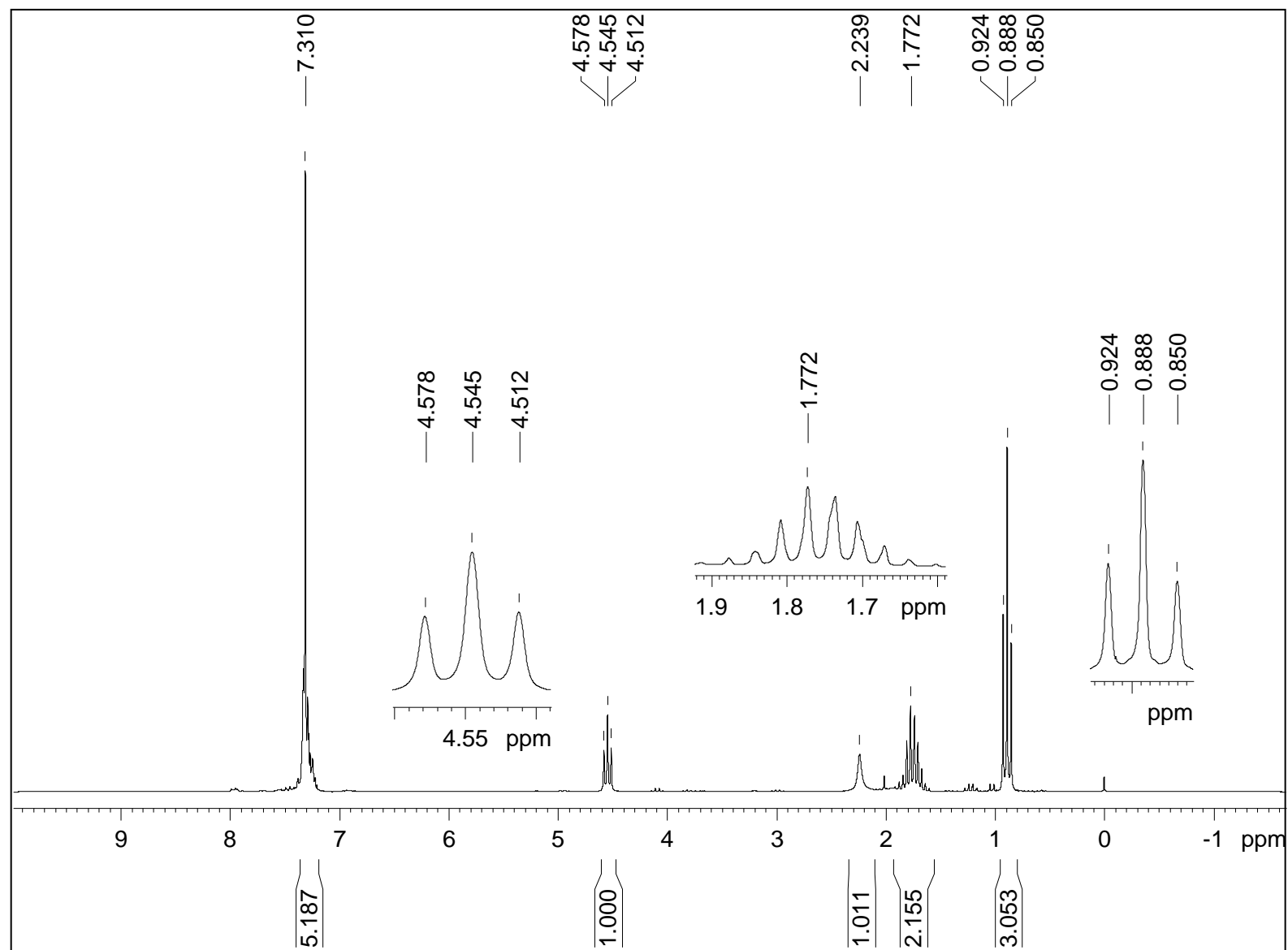
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 0,88 (t, J = 7,4 Hz, 3H); 1,77 (m, 2H); 2,23 (s largo, 1H); 4,54 (t, J = 6,6 Hz, 1H); 7,31 (m, 5H).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 10,1; 31,8; 75,9; 128,0; 127,4; 128,3; 144,6.

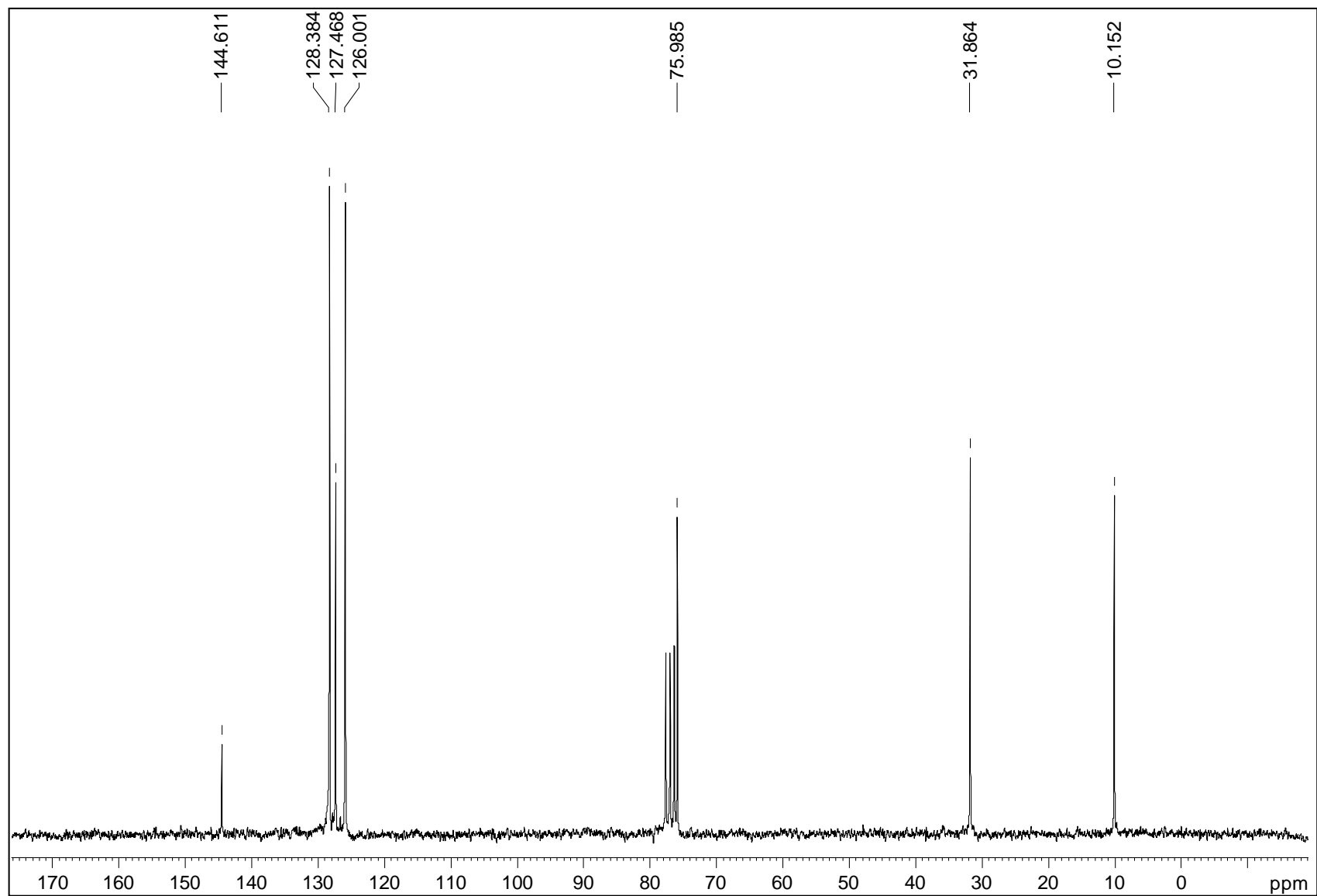




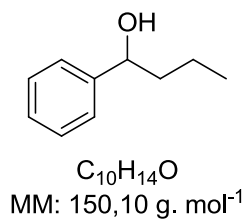
Espectro de FTIR do fenil-1-propanol



Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do fenil-1-propanol.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do fenil-1-propanol.



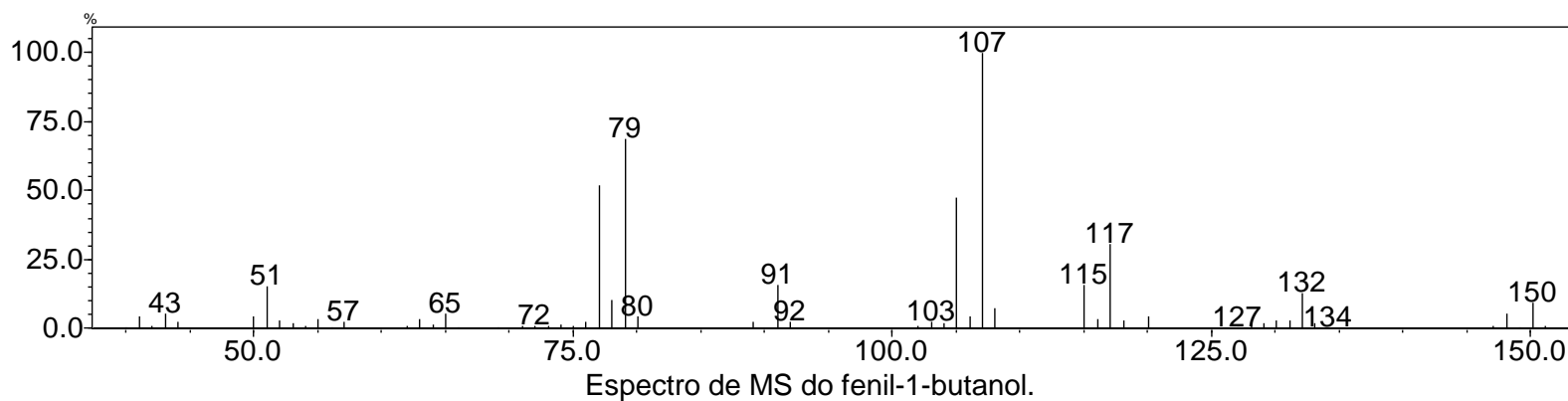
1-fenilbutanol (**5**) Rendimento: 80%.

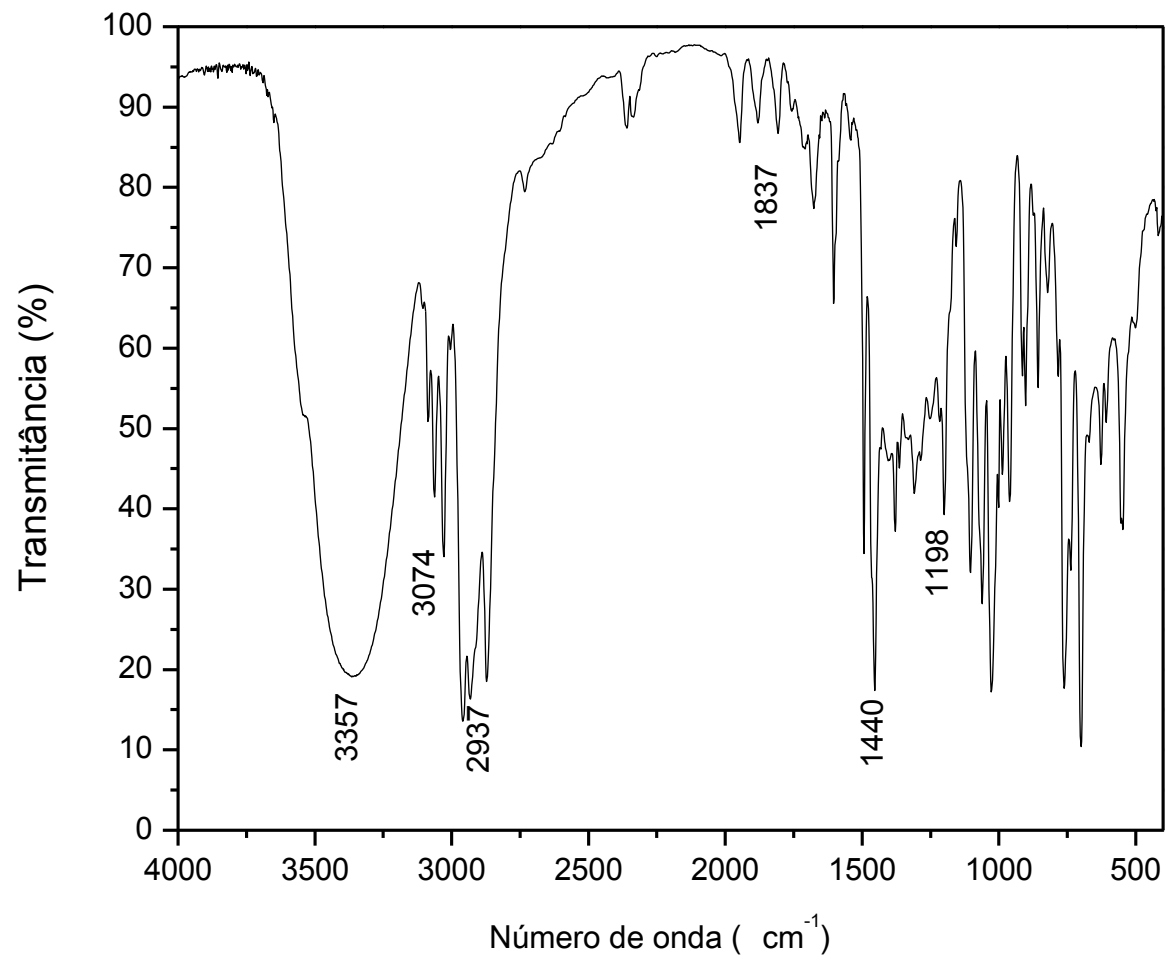
CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 150 (M^+ , 9%); 117 (30%); 115 (15%); 107 (100%); 79 (70%); 77 (41%); 51 (13%).

IV (cm^{-1}): 3357, 3074, 2937, 1837, 1440, 1198.

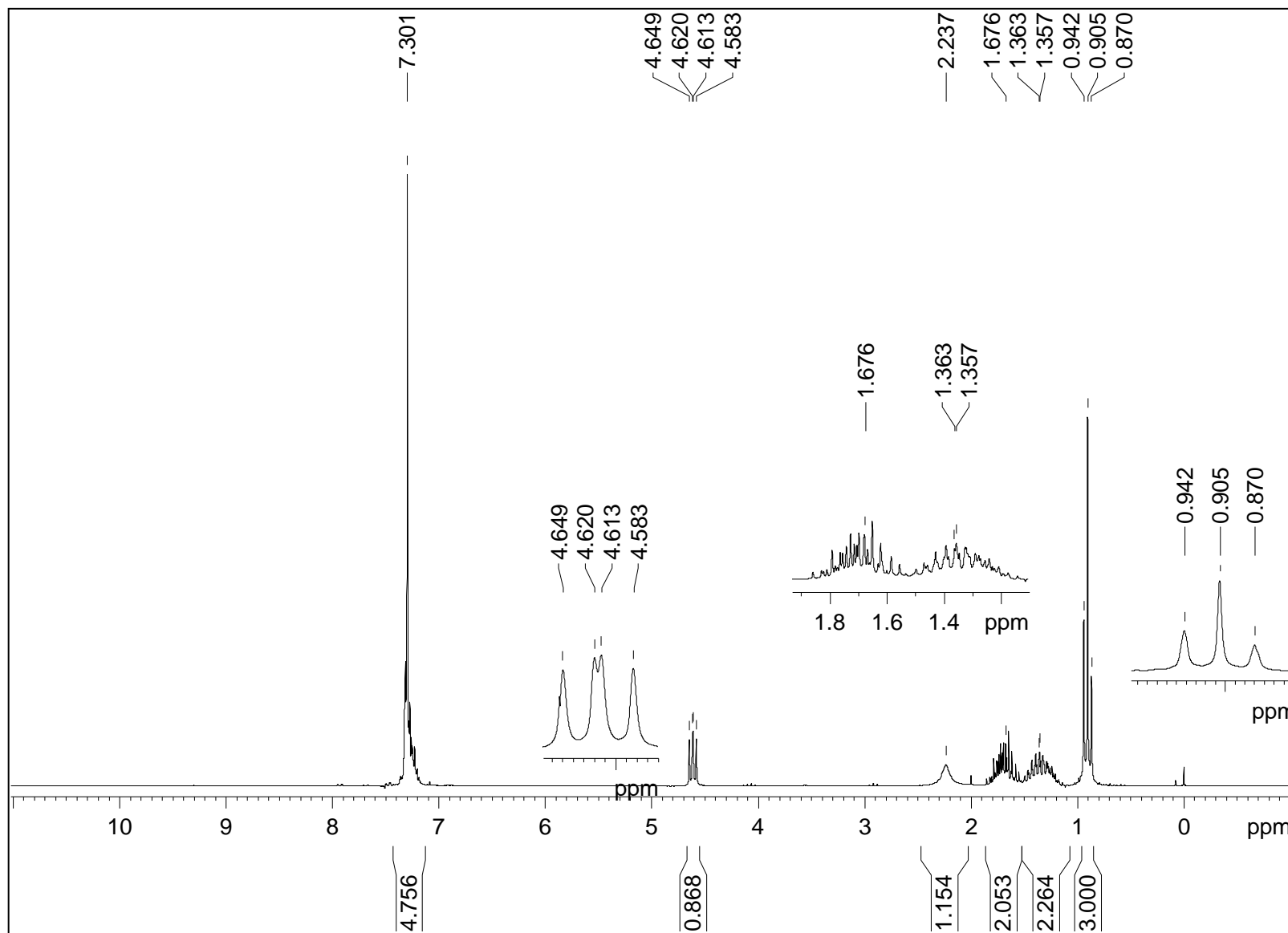
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 0,90 (t, J = 7,2, 3H); 1,35 (m, 2H); 1,67 (m, 2H); 2,21 (s, 1H); 4,62 (dd, J = 6 Hz e 7,3 Hz, 1H); 7,30 (m, 5H).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 13,9; 19,0; 41,2; 74,3; 125,9; 127,4; 128,3; 144,9.

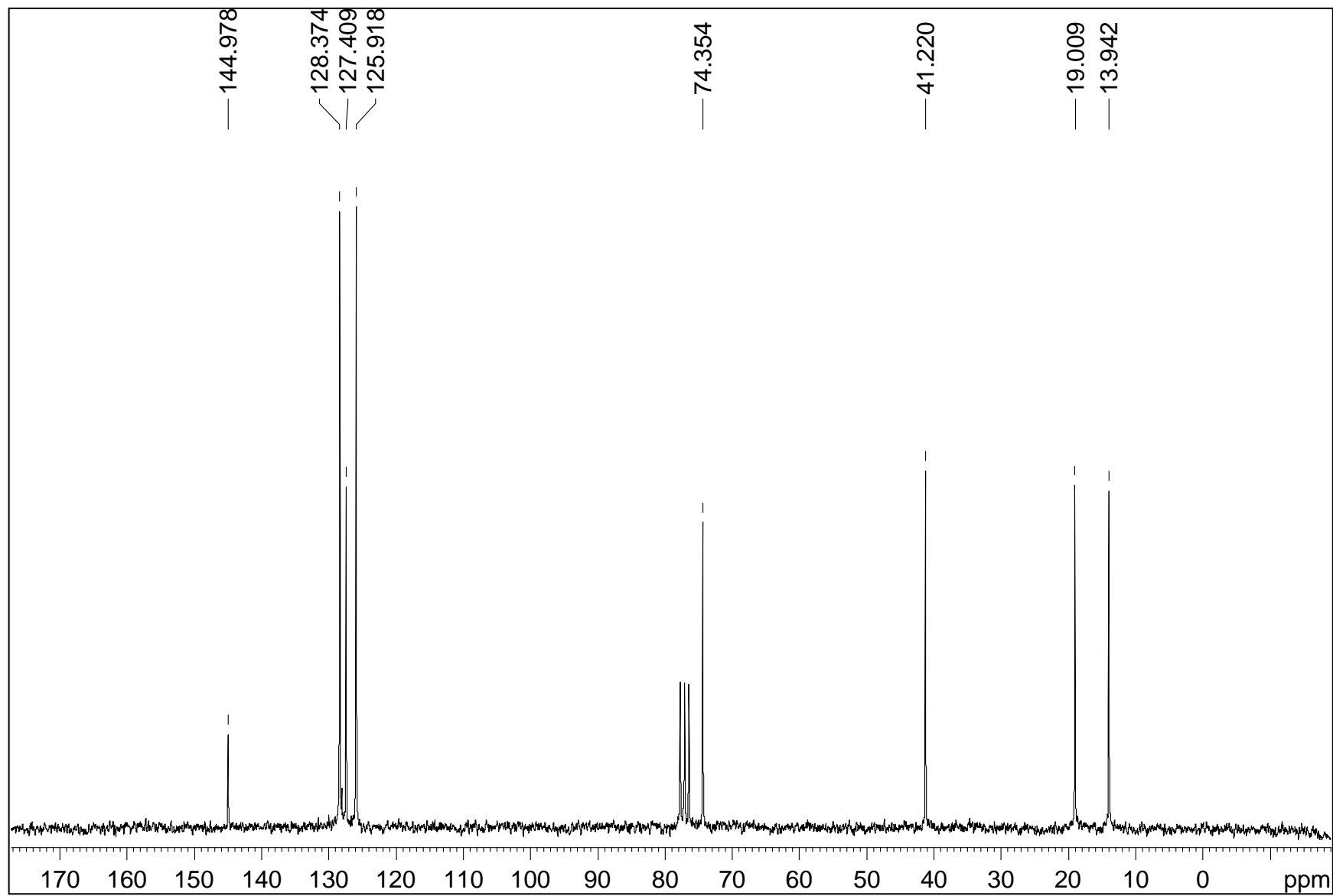




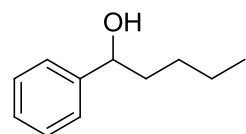
Espectro de FTIR do fenil-1-butanol.



Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do fenil-1-butanol.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do fenil-1-butanol.



$C_{11}H_{16}O$
MM: 164,12 g. mol⁻¹

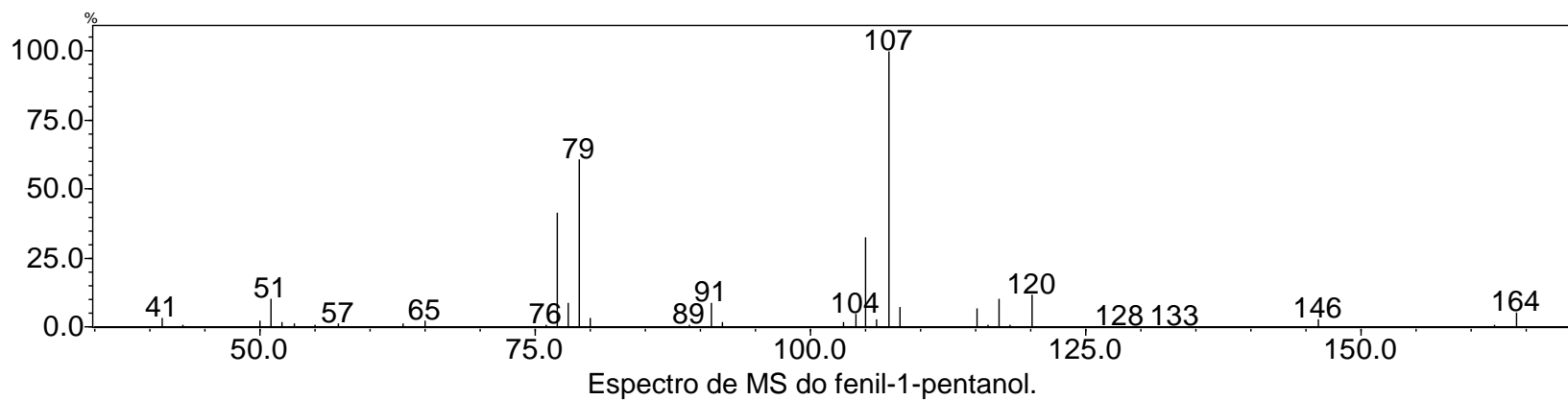
1-fenilpentanol (**6**) Rendimento: 60%.

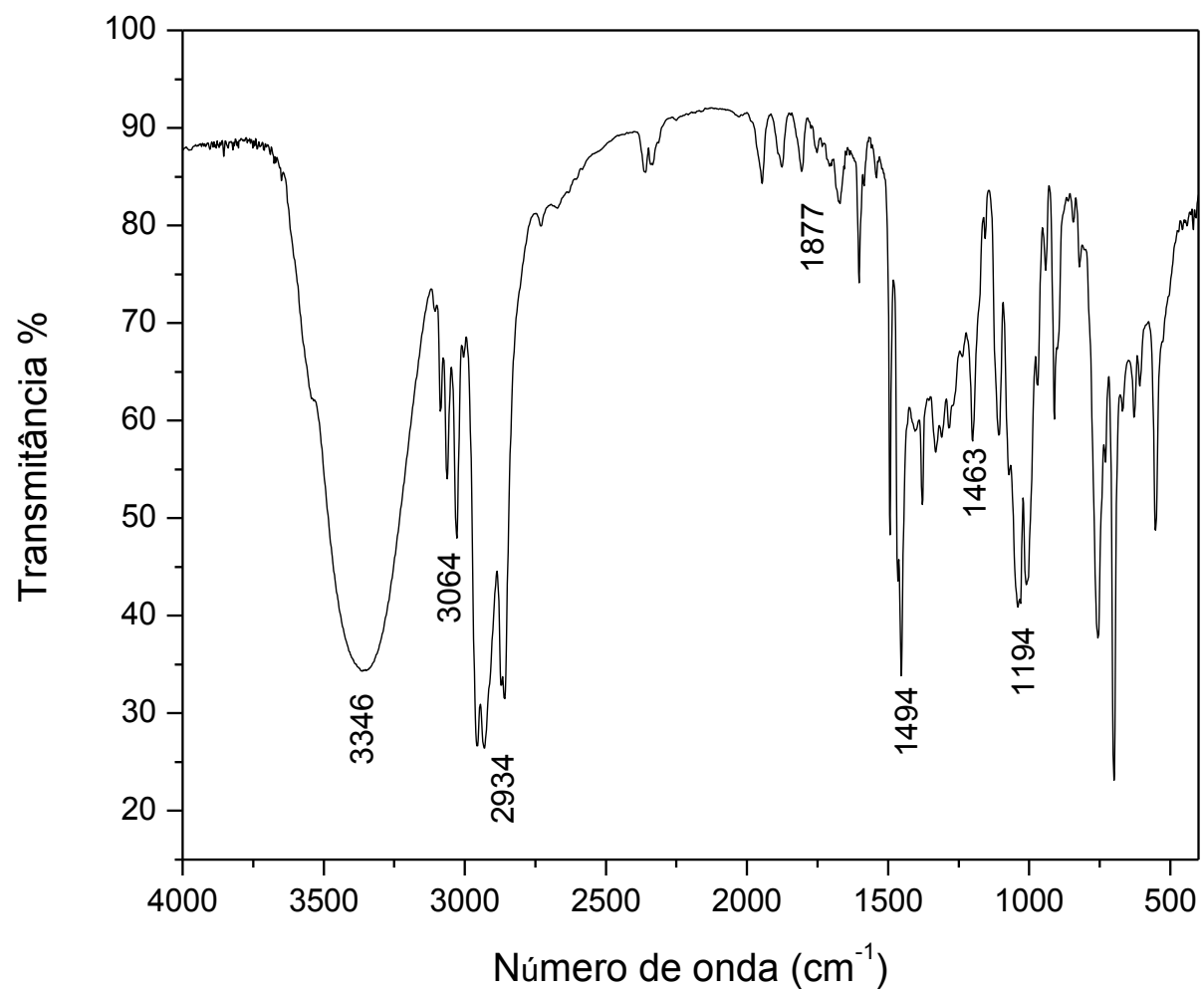
CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 164 (M^+ , 5%); 120 (12%); 107 (100%); 104 (33%); 91 (9%); 79 (61%); 77 (42%); 51(10%).

IV (cm⁻¹): 3346, 2934, 1877, 1494, 1463, 1194.

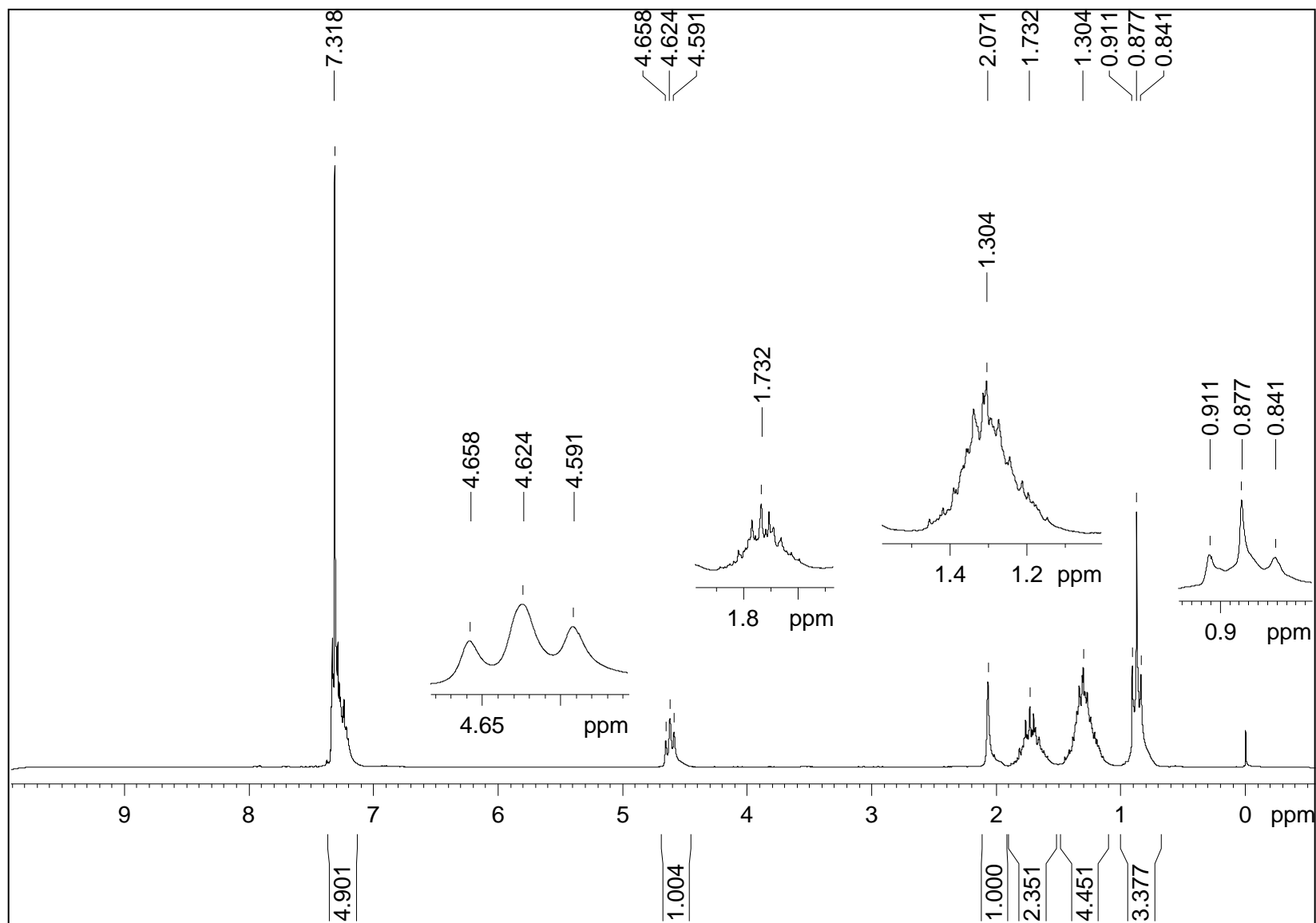
RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 0,87 (t, J = 7,0, 3H); 1,30 (m, 4H); 1,73 (m, 2H); 2,07 (s largo, 1H); 4,62 (t; J = 6,8 Hz; 1H); 7,30 (m, 5H).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 13,9; 22,6; 27,9; 38,8; 74,6; 125,8; 127,4; 128,4; 144,9.

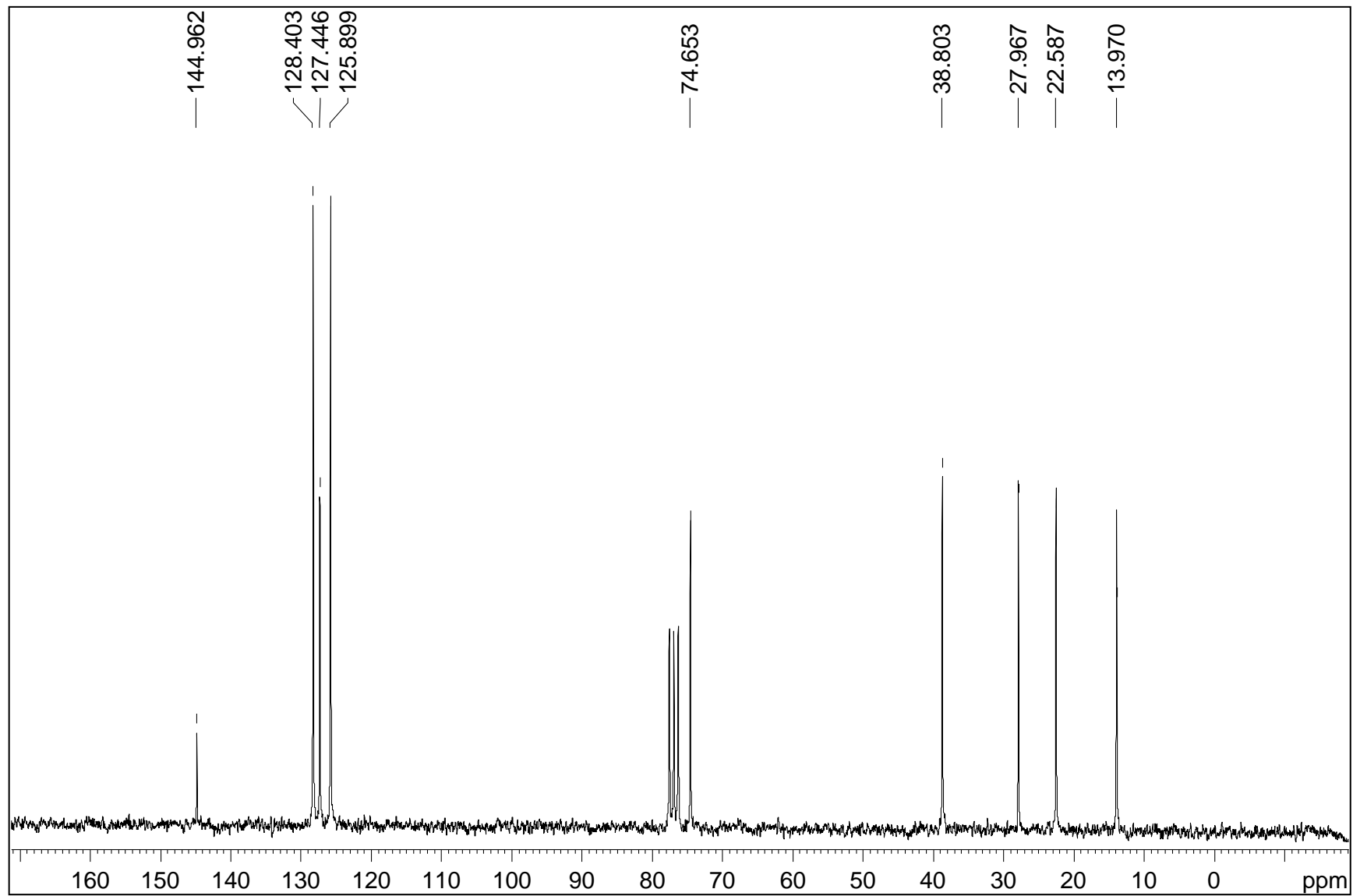




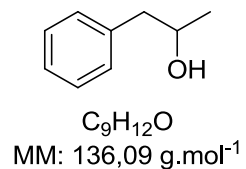
Espectro de FTIR do fenil-1-pentanol.



Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do fenil-1-pentanol.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do fenil-1-pentanol.



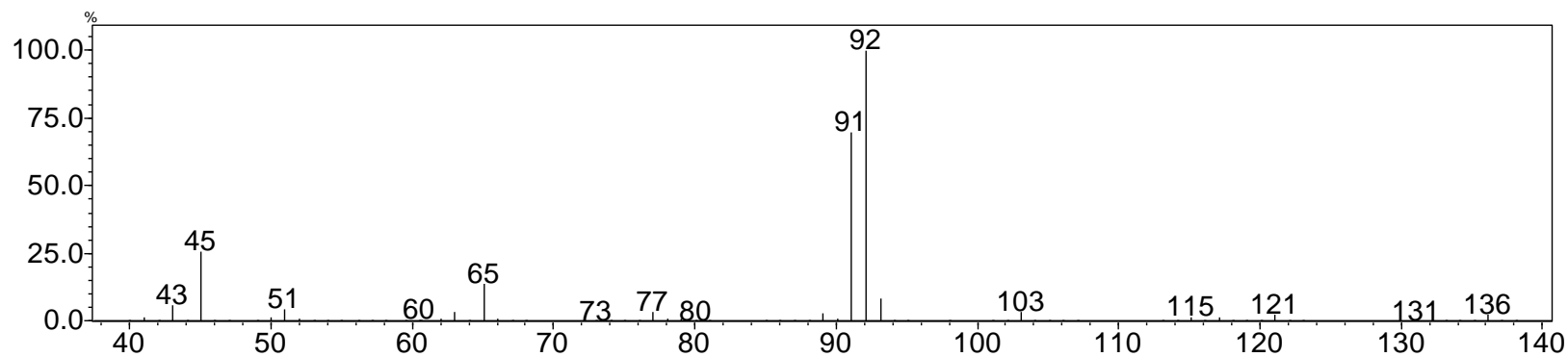
1-fenilpropan-2-ol (**7**):

CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 136 (2,7%); 121 (2,8%); 115 (2%); 103 (4%); 92 (100%); 91 (70%); 77 (3,7%); 65 (14%); 51 (4,5%); 45 (26%); 43 (6,2%).

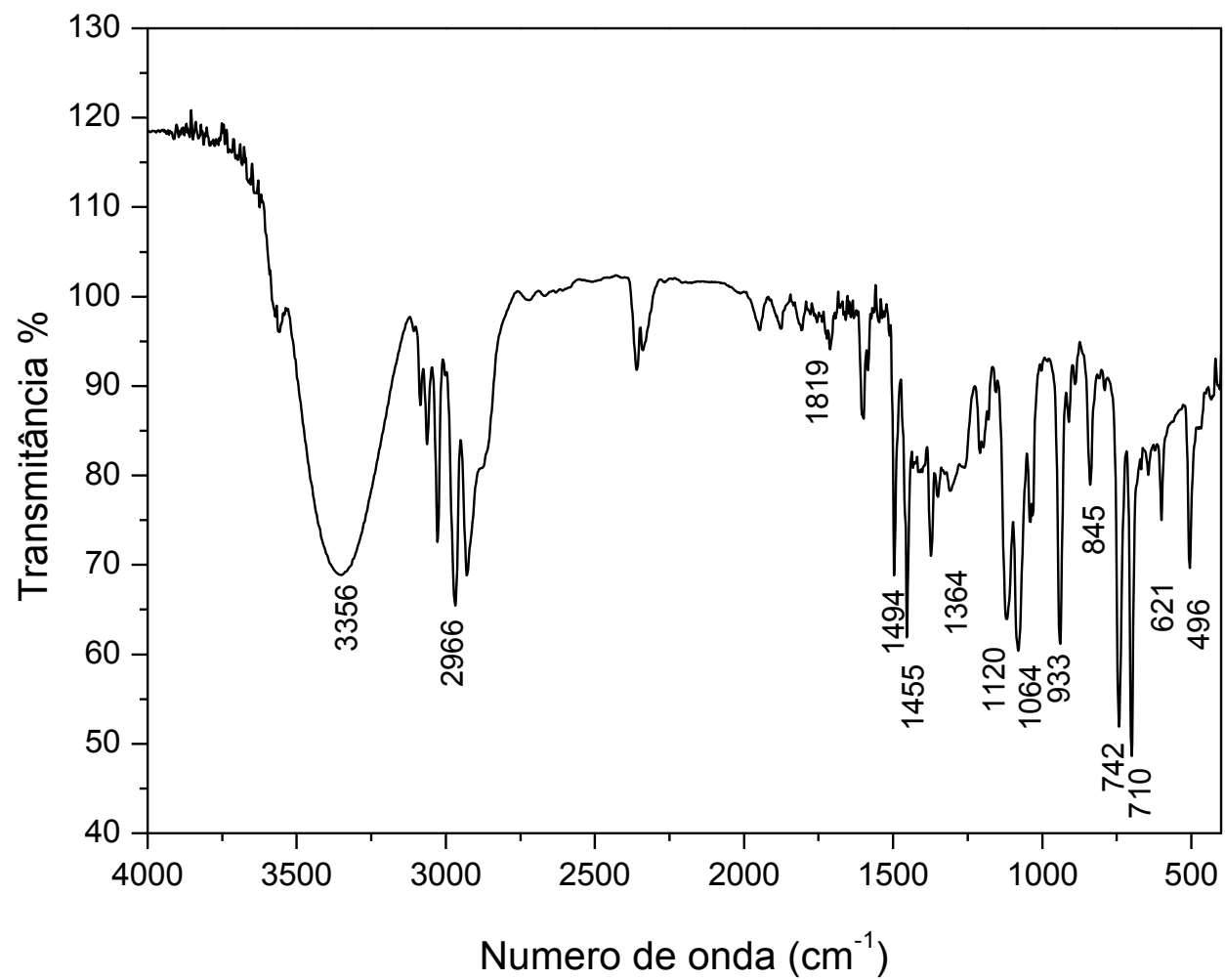
IV (cm⁻¹): 3356, 2966, 1819, 1494, 1455, 1364, 1120, 1064, 933, 845, 742, 710, 621, 496.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,20 (d, J = 6,2, 3H); 1,96 (s, 1H); 2,70 (m, 2H); 3,96 (sext, J = 6,2, 1H); 7,22 (m, 5H).

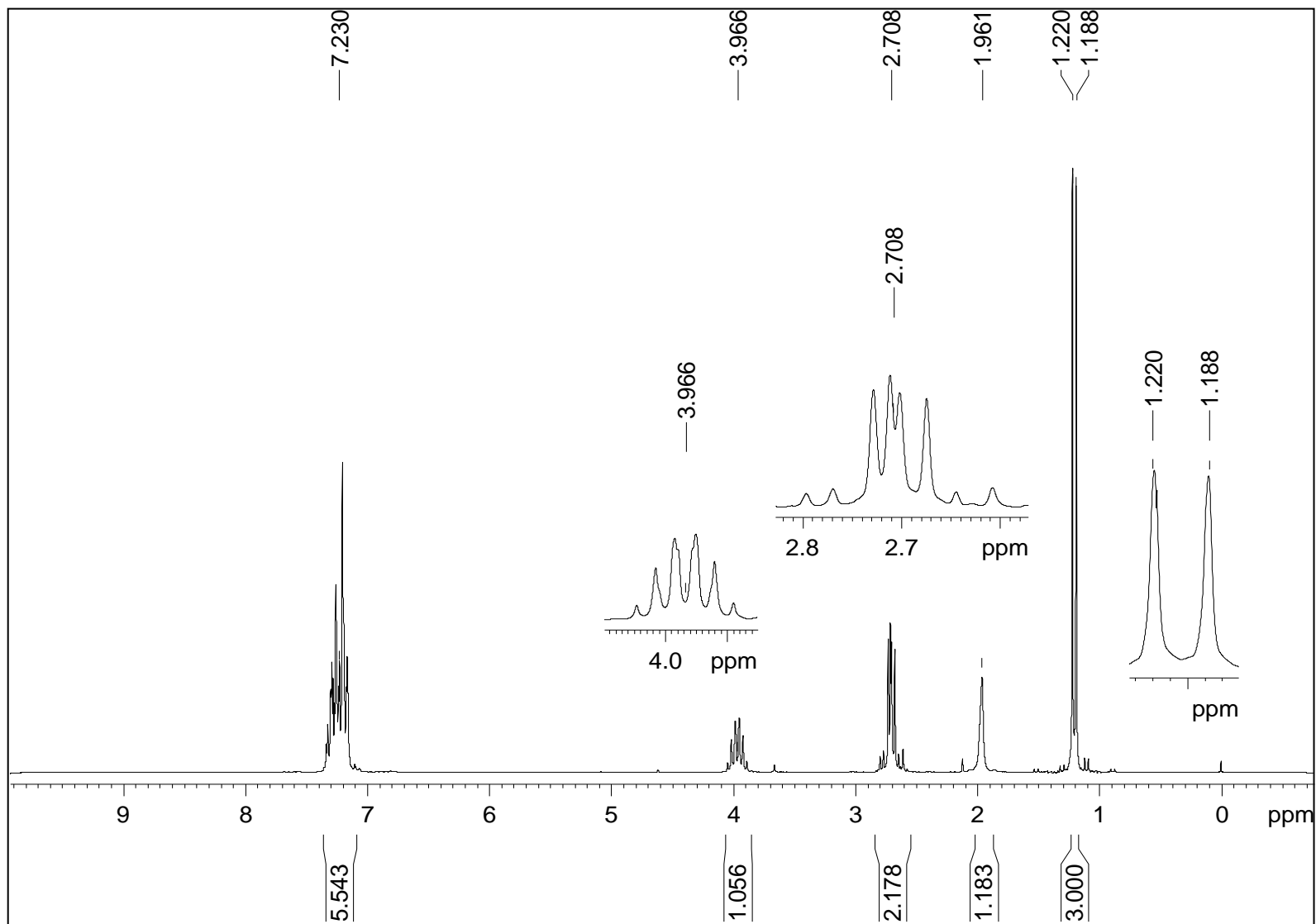
RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 22,7; 45,8; 69,1; 126,4; 128,5; 129,4; 138,6.



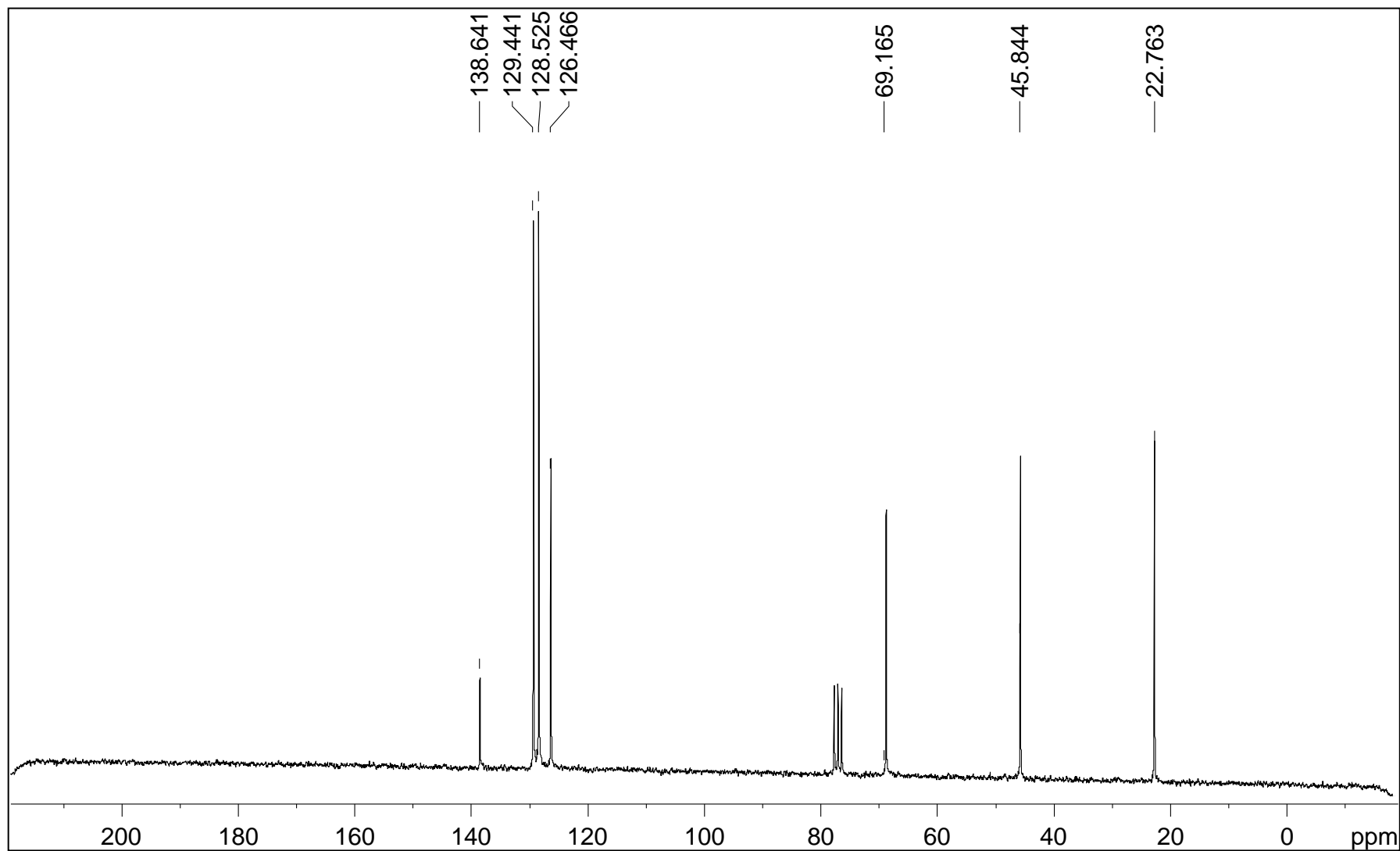
Espectro de MS do 1-fenil-propan-2-ol.



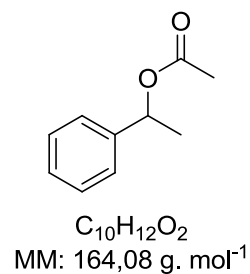
Espectro de FTIR do 1-fenil-propan-2-ol.



Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 1-fenil-propan-2-ol.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do 1-fenil-propan-2-ol.



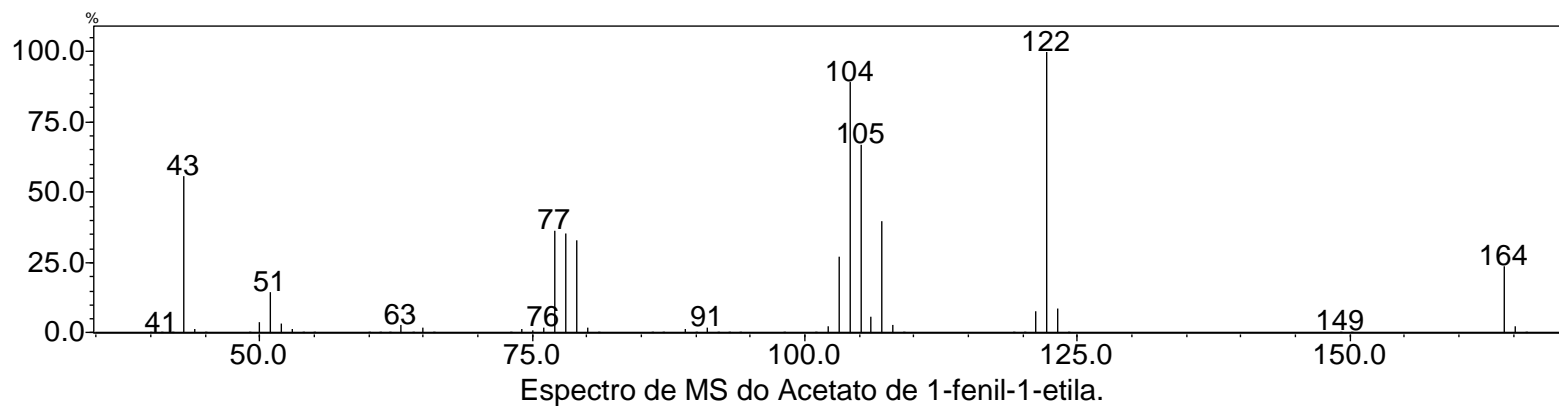
Acetato de 1-feniletila (**1a**) Rendimento: 75%.

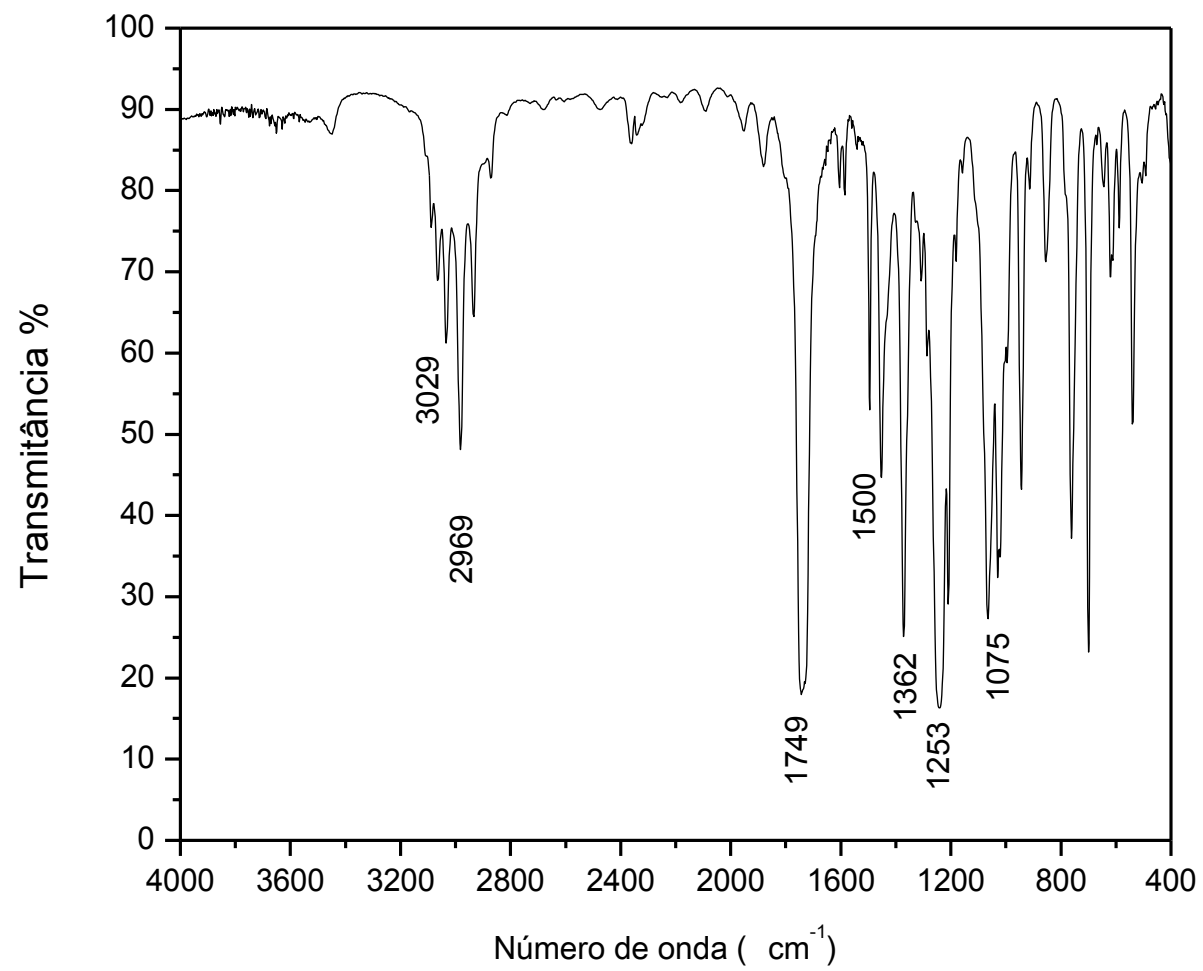
CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 164 (M^+ , 23%); 122 (100%); 105 (67%); 104 (89%); 107 (36%); 51 (15%); 43 (55%).

IV (cm^{-1}): 3029, 2969, 1749, 1500, 1362, 1253, 1075.

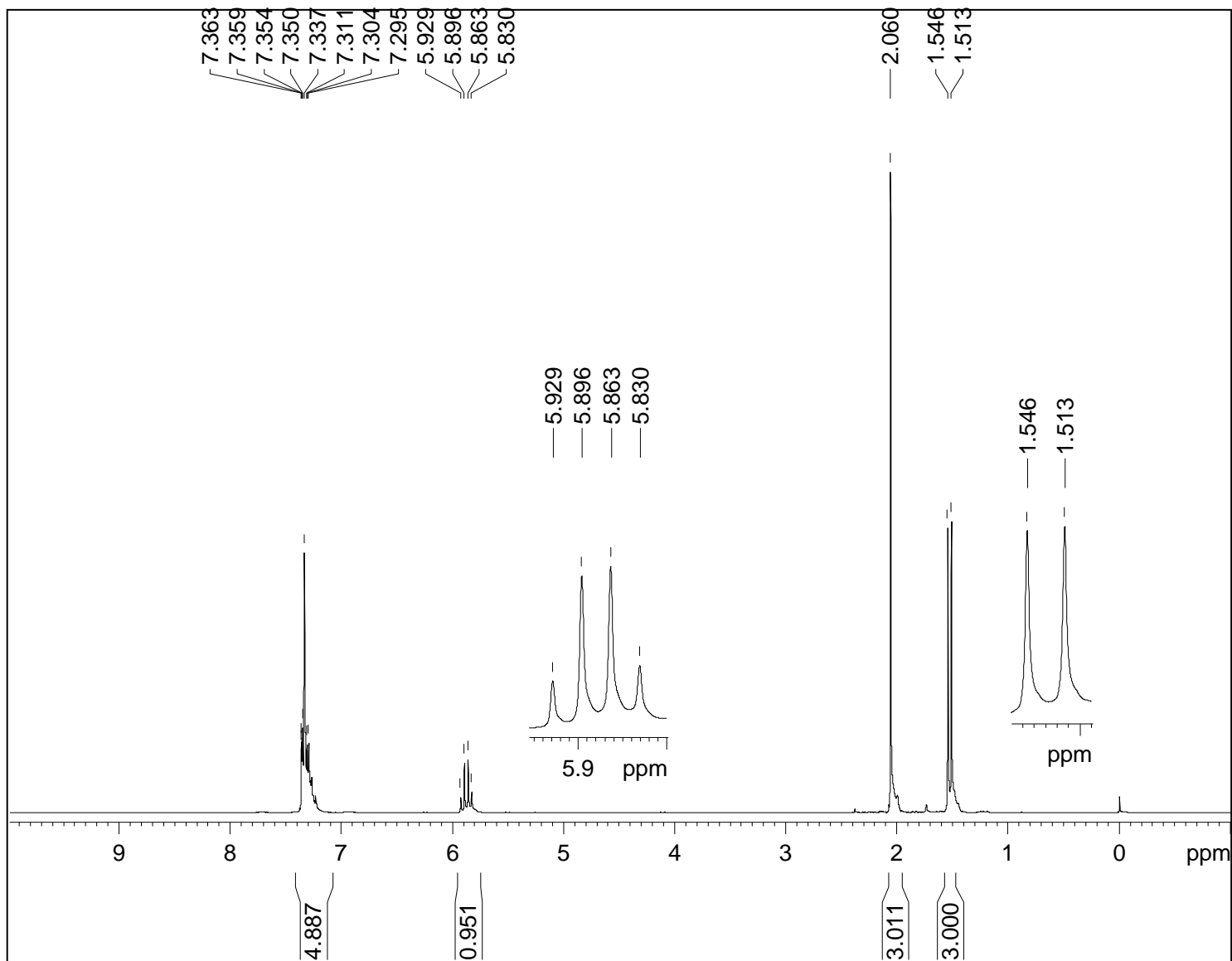
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 1,52 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H); 2,06 (s, 3H); 5,87 (q, $J = 6,6$, 1H); 7,33 (m, 5H).

RMN de ^{13}C (50 MHz - CDCl_3), δ (ppm): 21,3; 22,1; 72,3; 126,0; 127,8; 128,5; 141,6; 170,2.

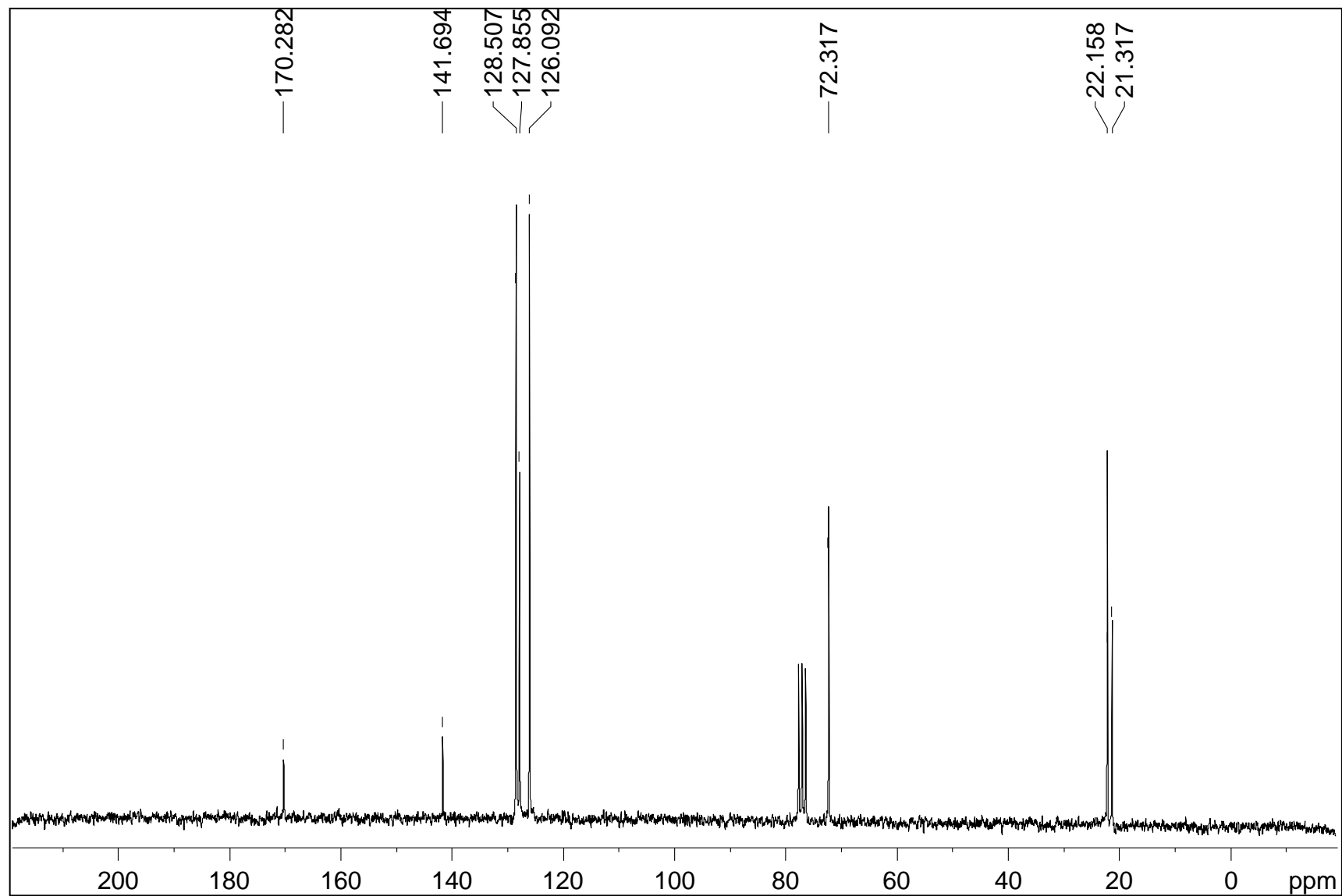




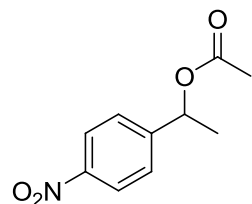
Espectro de FTIR do Acetato de 1-fenil-1-etila.



Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) do Acetato de 1-fenil-1-etila.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do Acetato de 1-fenil-1-etila.



$C_{10}H_{11}NO_4$
MM: 209,07 g.mol⁻¹

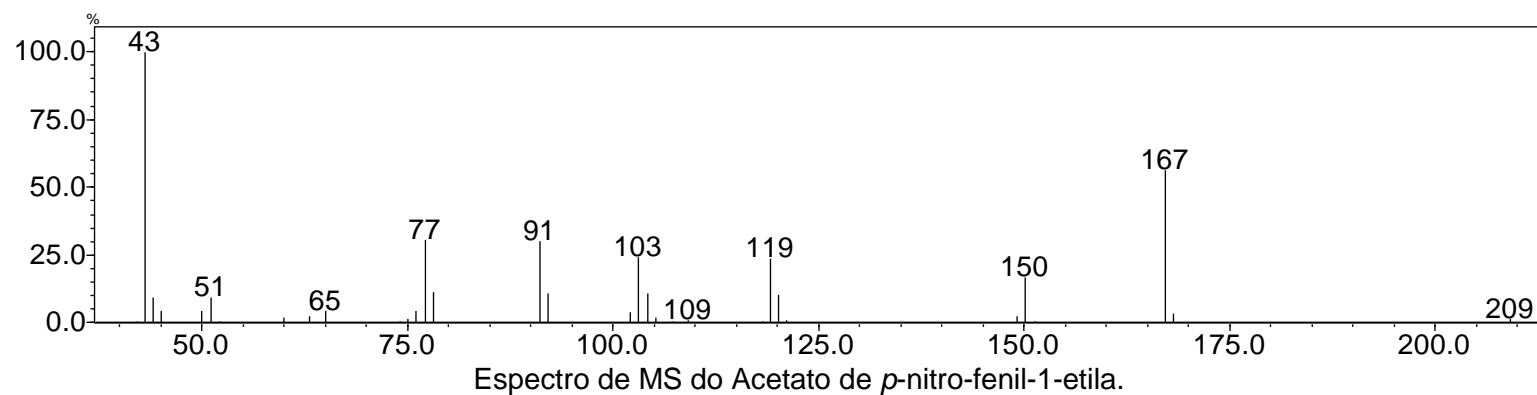
Acetato de *p*-nitro-1-feniletila (**2a**) Rendimento: 82%.

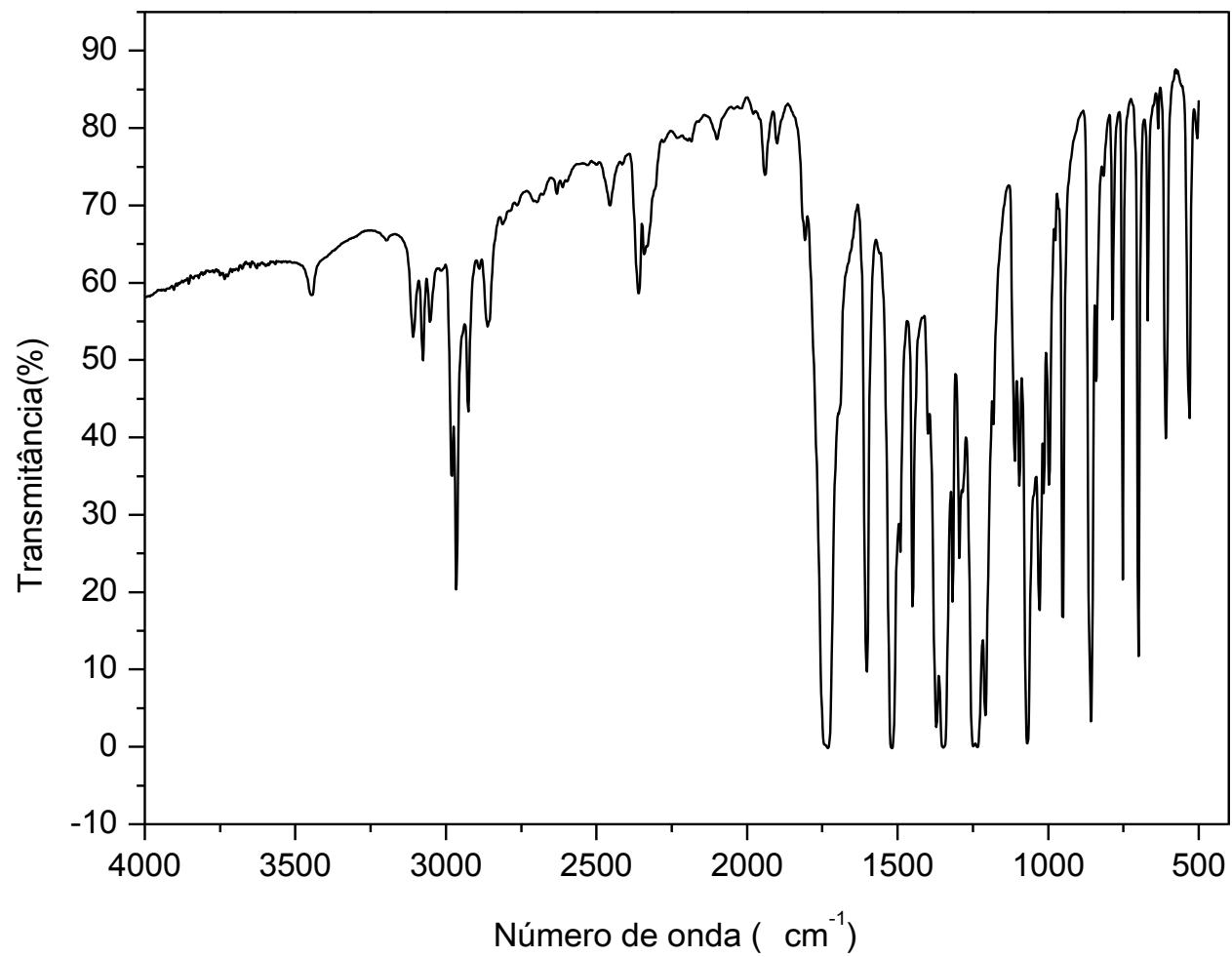
CG-EM (70 eV), *m/z* (intensidade relativa): 209 (M^+ , 1%); 167 (56%); 150 (16%); 119 (23%); 103 (24%); 91 (29%); 77 (30%); 43 (100%).

IV (cm⁻¹): 2961, 2353, 1725, 1602, 1510, 1355, 1242, 1067, 851, 697, 604, 532.

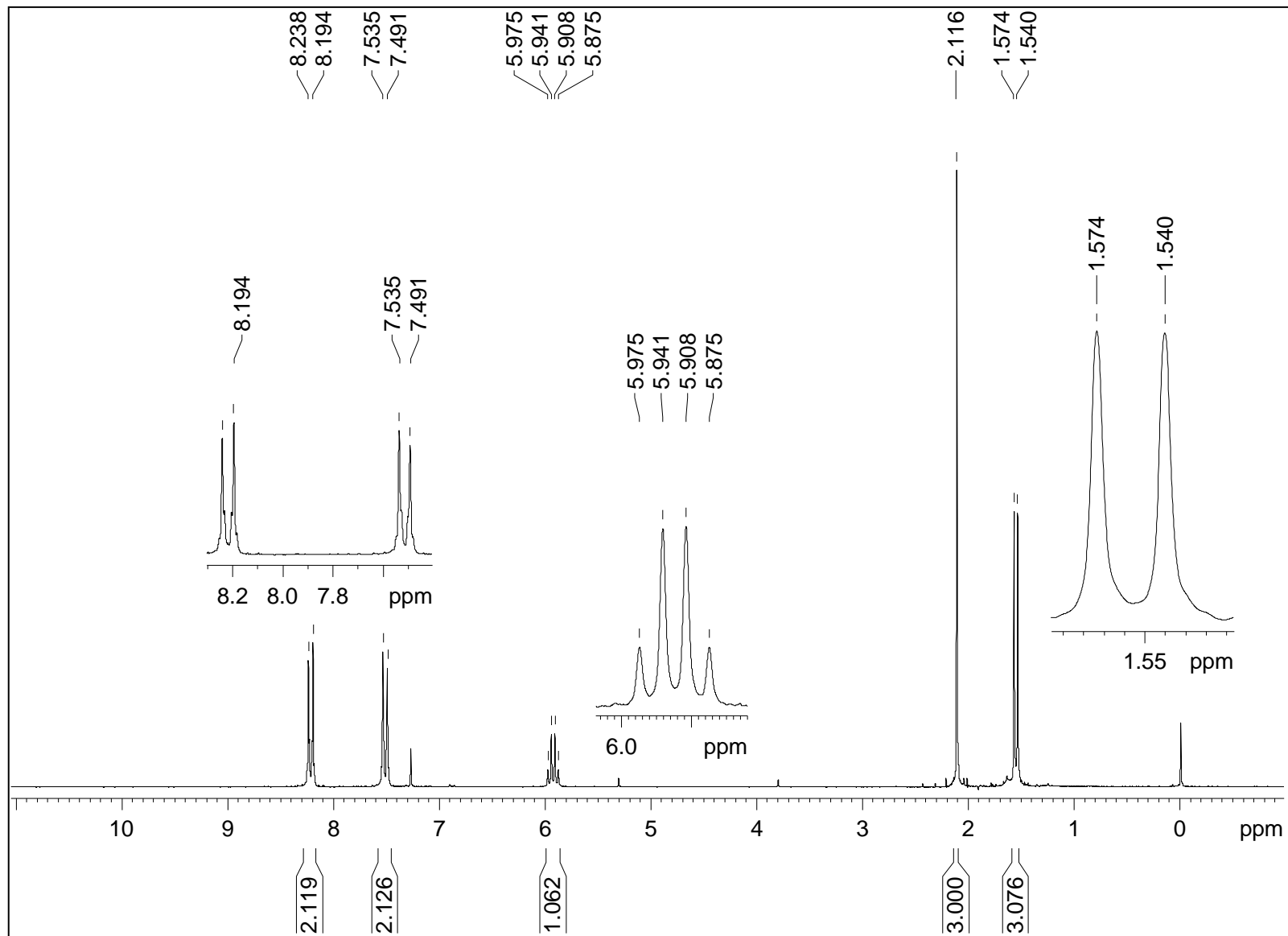
RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,56 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); 2,11 (s, 3H); 5,92 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H); 7,51 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H); 8,21 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H).

RMN de ¹³C (50 MHz - CDCl₃), δ (ppm): 21,1; 22,2; 71,2; 123,8; 126,7; 148,9; 170,0.

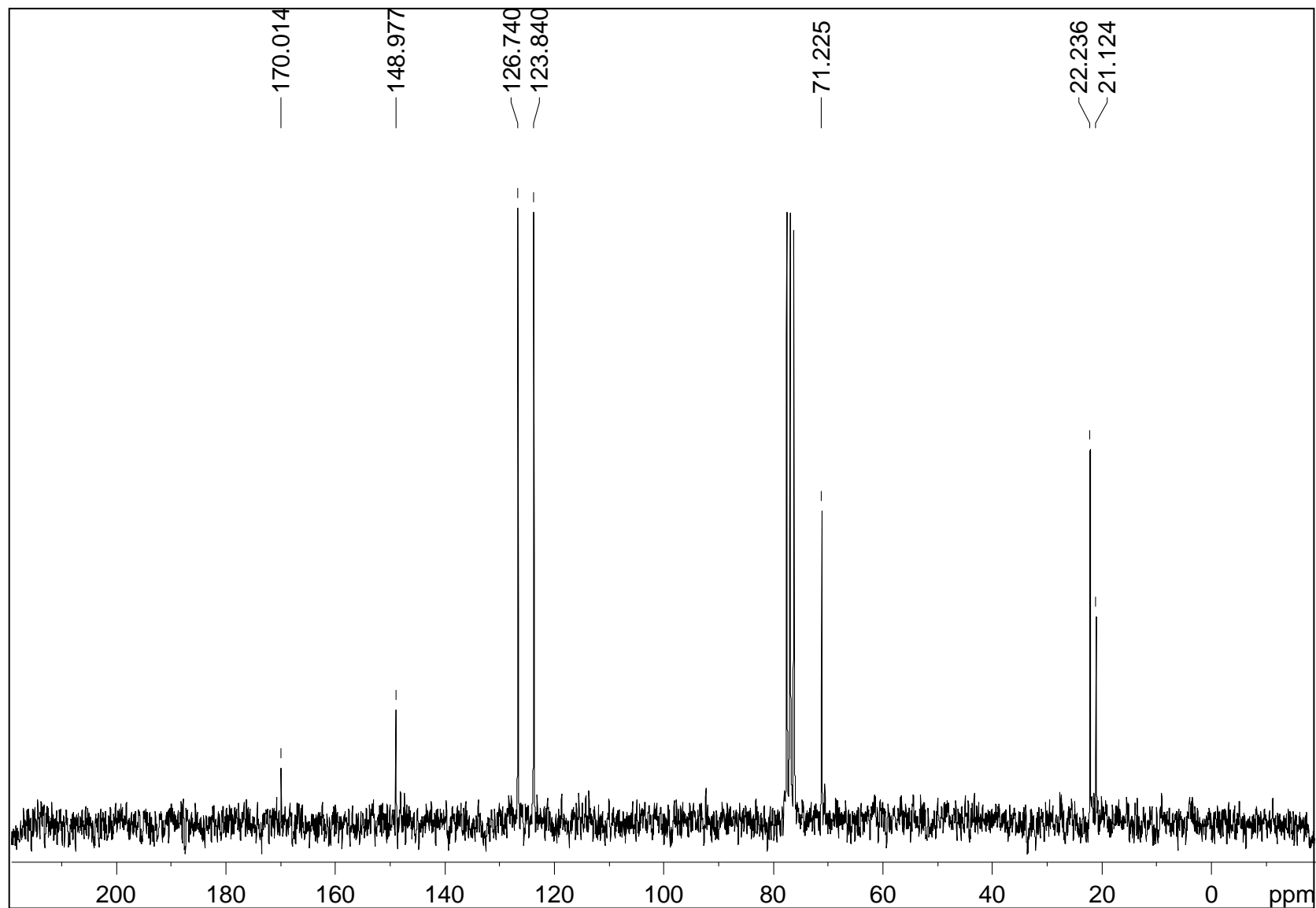




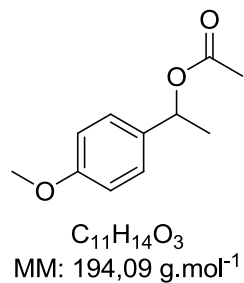
Espectro de FTIR do Acetato de *p*-nitro-fenil-1-etila.



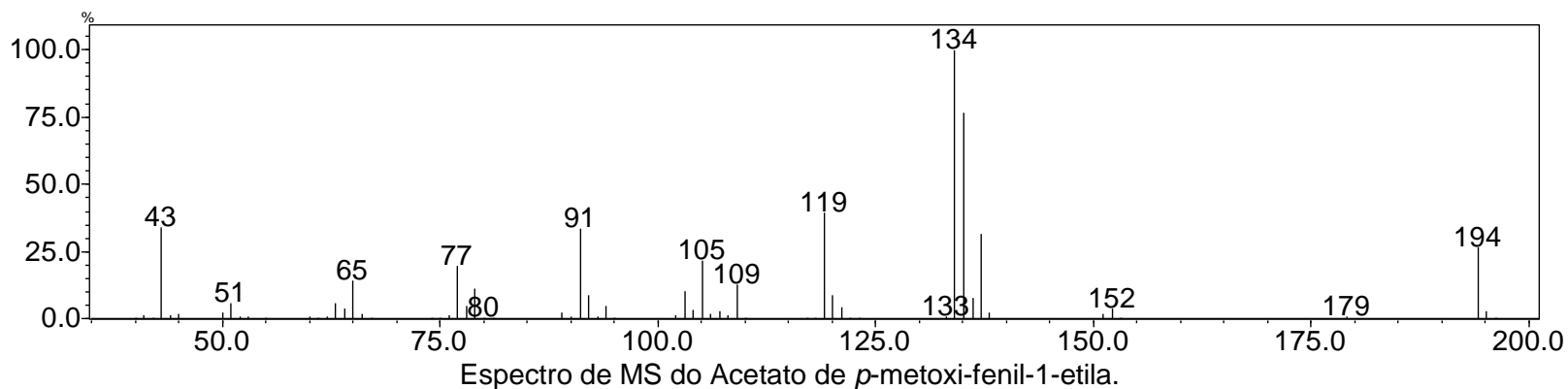
Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do Acetato de *p*-nitro-fenil-1-etila.

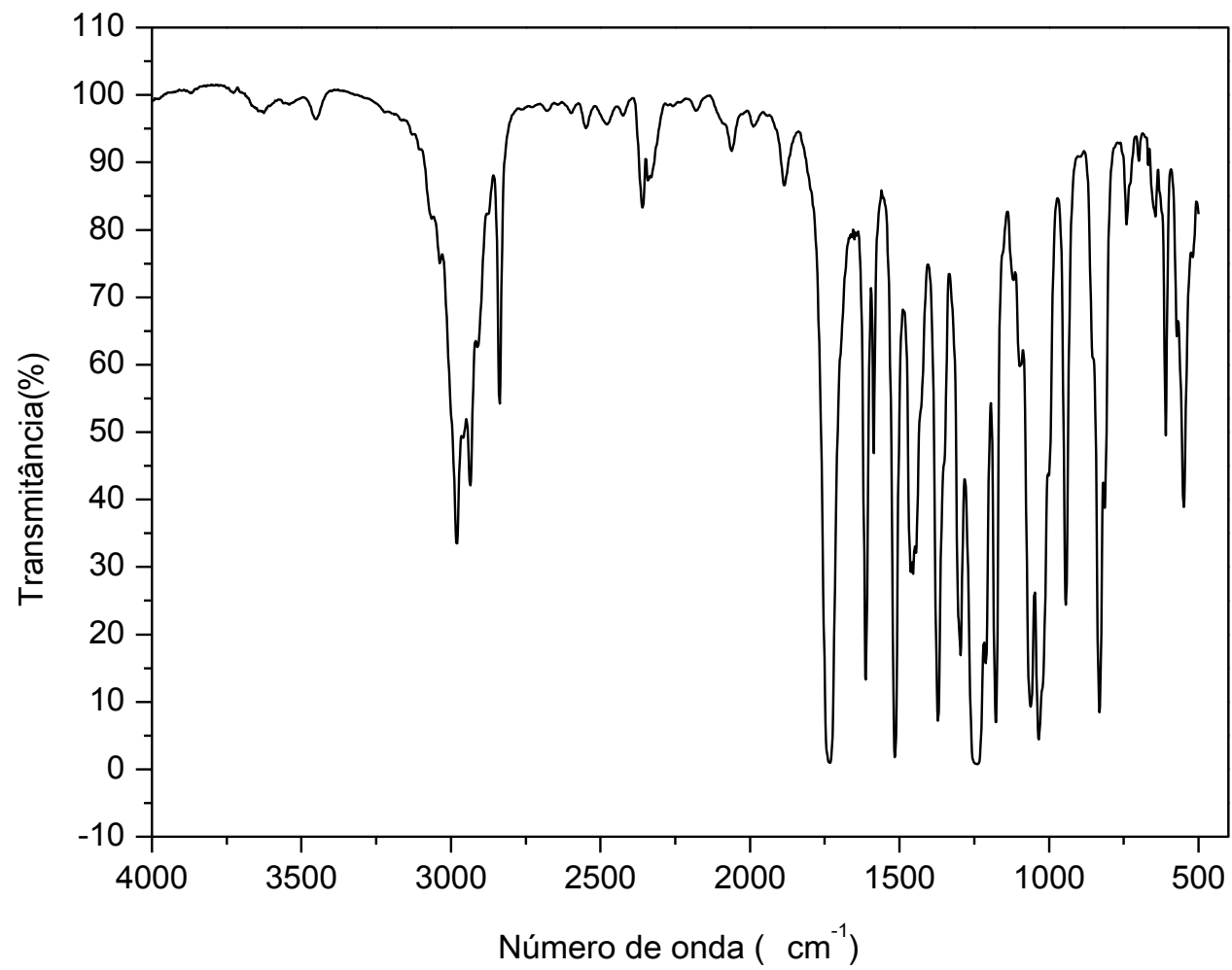


Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do Acetato de *p*-nitro-fenil-1-etila.

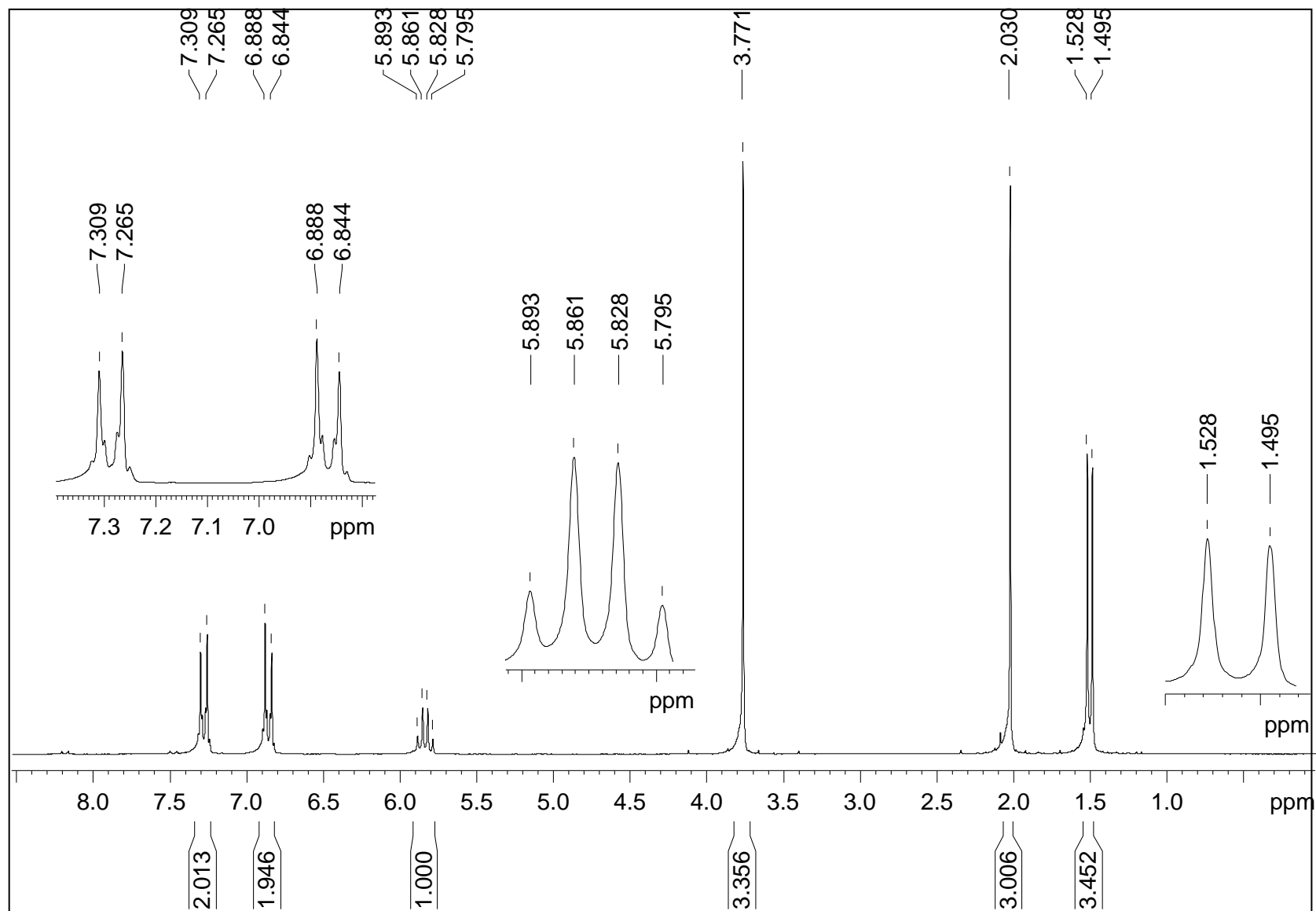


Acetato de *p*-metoxi-1-feniletila (**3a**) Rendimento: 86%.
 CG-EM (70 eV), *m/z* (intensidade relativa): 194 (M^+ , 27%);
 134 (100%); 119 (40%); 105 (22%); 91 (33%); 77 (20%);
 43 (34%).
 IV (cm^{-1}): 2981, 2838, 2353, 2065, 1890, 1736, 1622,
 1510, 1376, 1242, 1180, 1036, 831, 603, 552.
 RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 1,51 (d, J =
 6,5 Hz, 3H); 2,03 (s, 3H); 3,77 (s, 3H); 5,84 (q, J = 6,6 Hz,
 1H); 6,87 (d, J = 8,7 Hz, 2H); 7,29 (d, J = 8,7 Hz, 2H).
 RMN de ^{13}C (50 MHz - CDCl_3), δ (ppm): 21,3; 21,9; 55,1;
 71,9; 113,8; 127,5; 133,7; 159,2; 170,3.

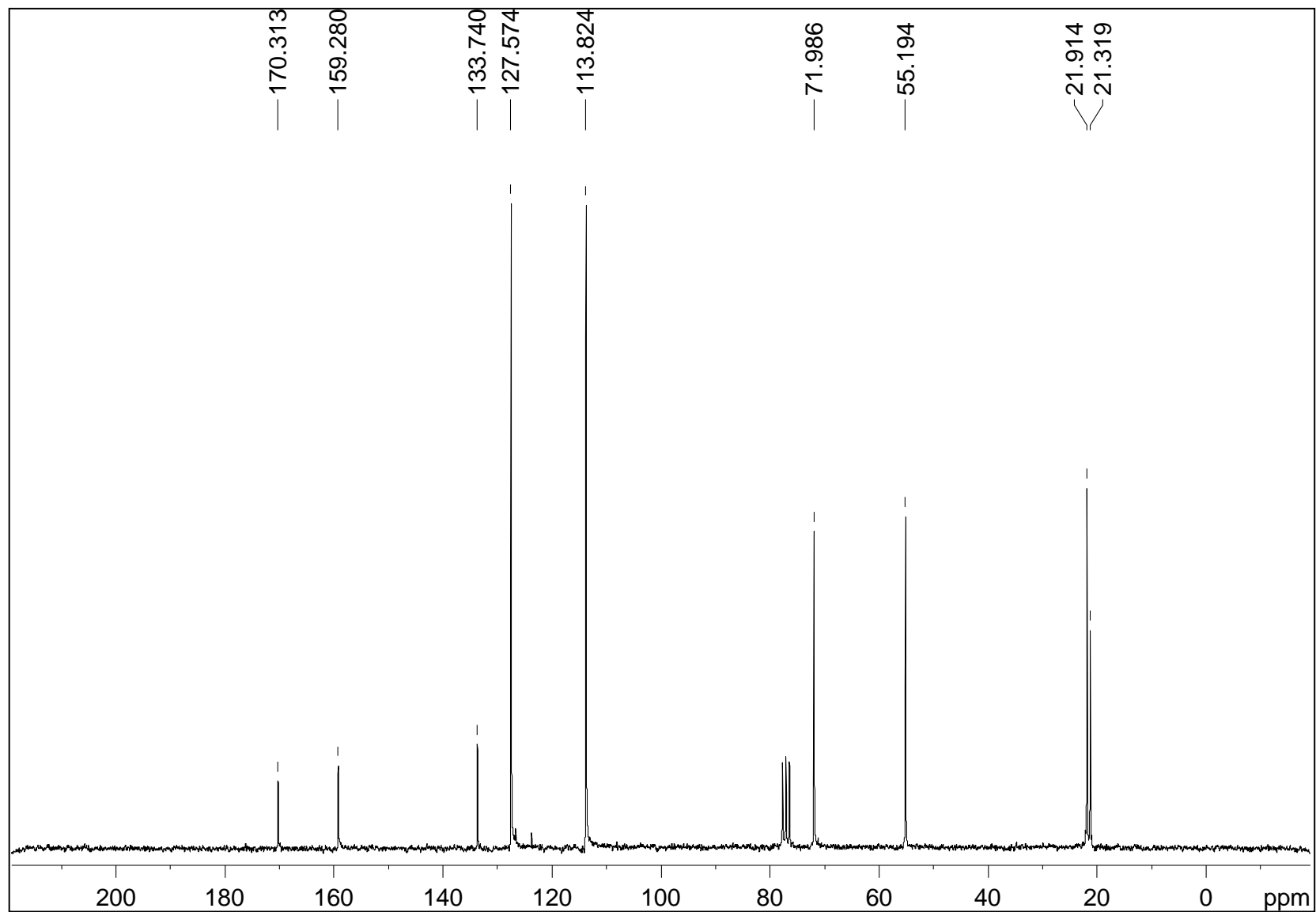




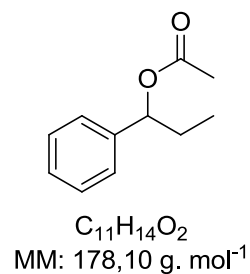
Espectro de FTIR do Acetato de *p*-metoxi-fenil-1-etila.



Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) do Acetato de *p*-metoxi-fenil-1-etila.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do Acetato de *p*-metoxi-fenil-1-etila.



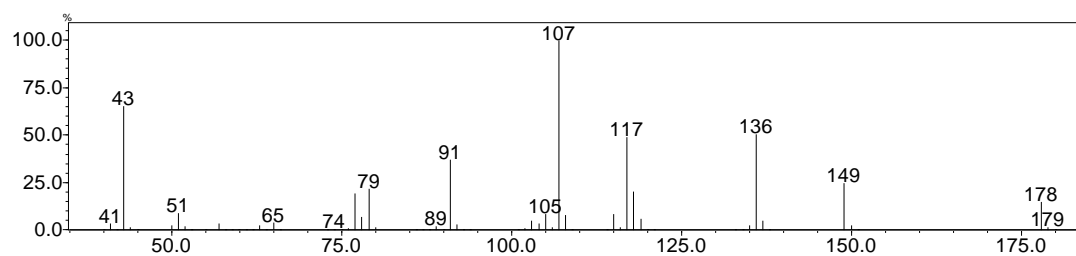
Acetato de 1-fenilpropila (**4a**) Rendimento: 70%.

CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 178 (15%); 149 (25%); 136 (51%); 117 (50%); 107 (100%); 91 (37%); 79 (22%); 77 (20%); 43 (65%).

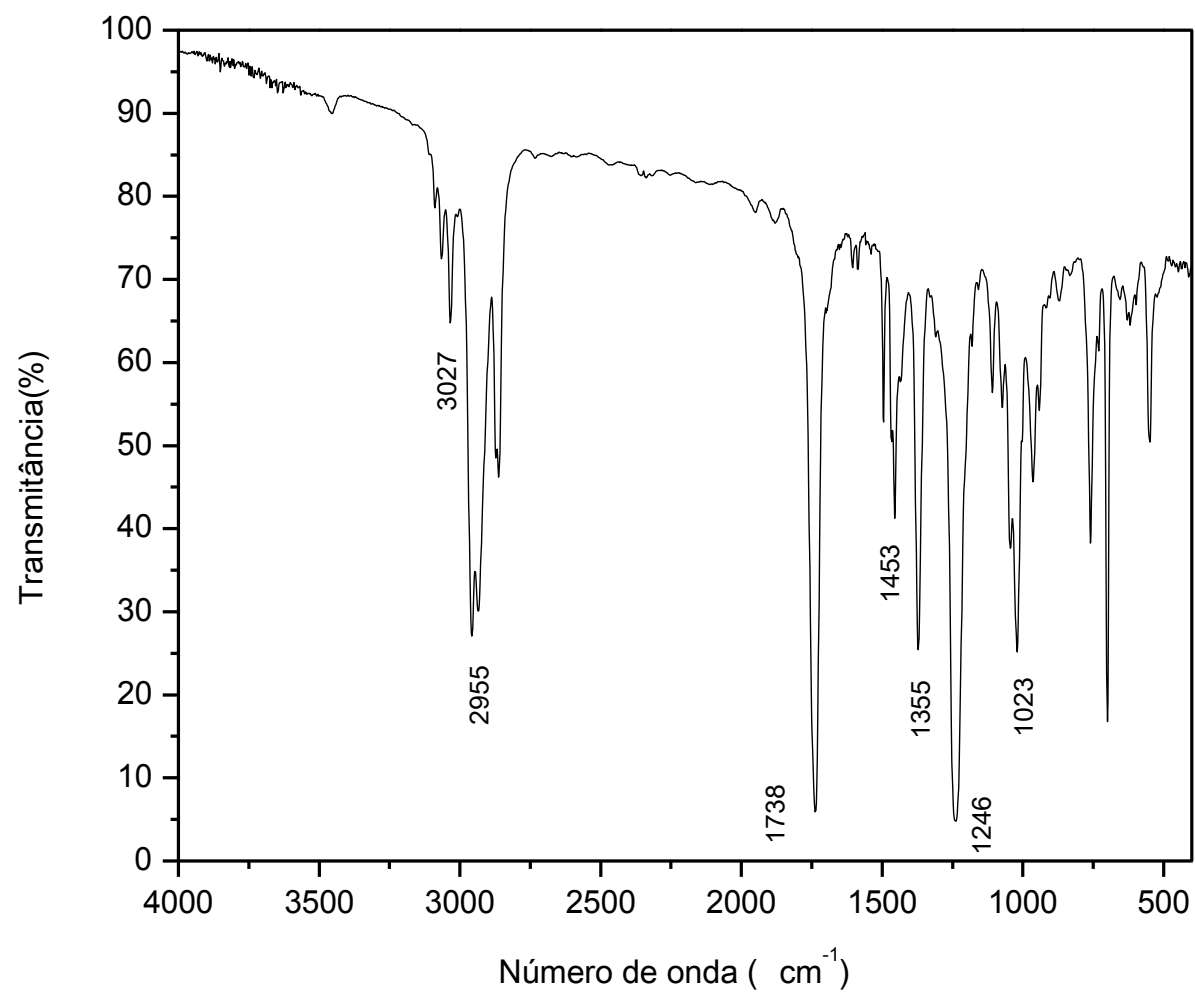
IV (cm⁻¹): 3027, 2955, 1738, 1453, 1355, 1246, 1023.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 0,87 (t, J = 7,3 Hz, 3H); 1,89 (m, 2H); 2,07 (s, 1H); 5,65 (t, J = 6,9, 1H); 7,3 (m, 5H).

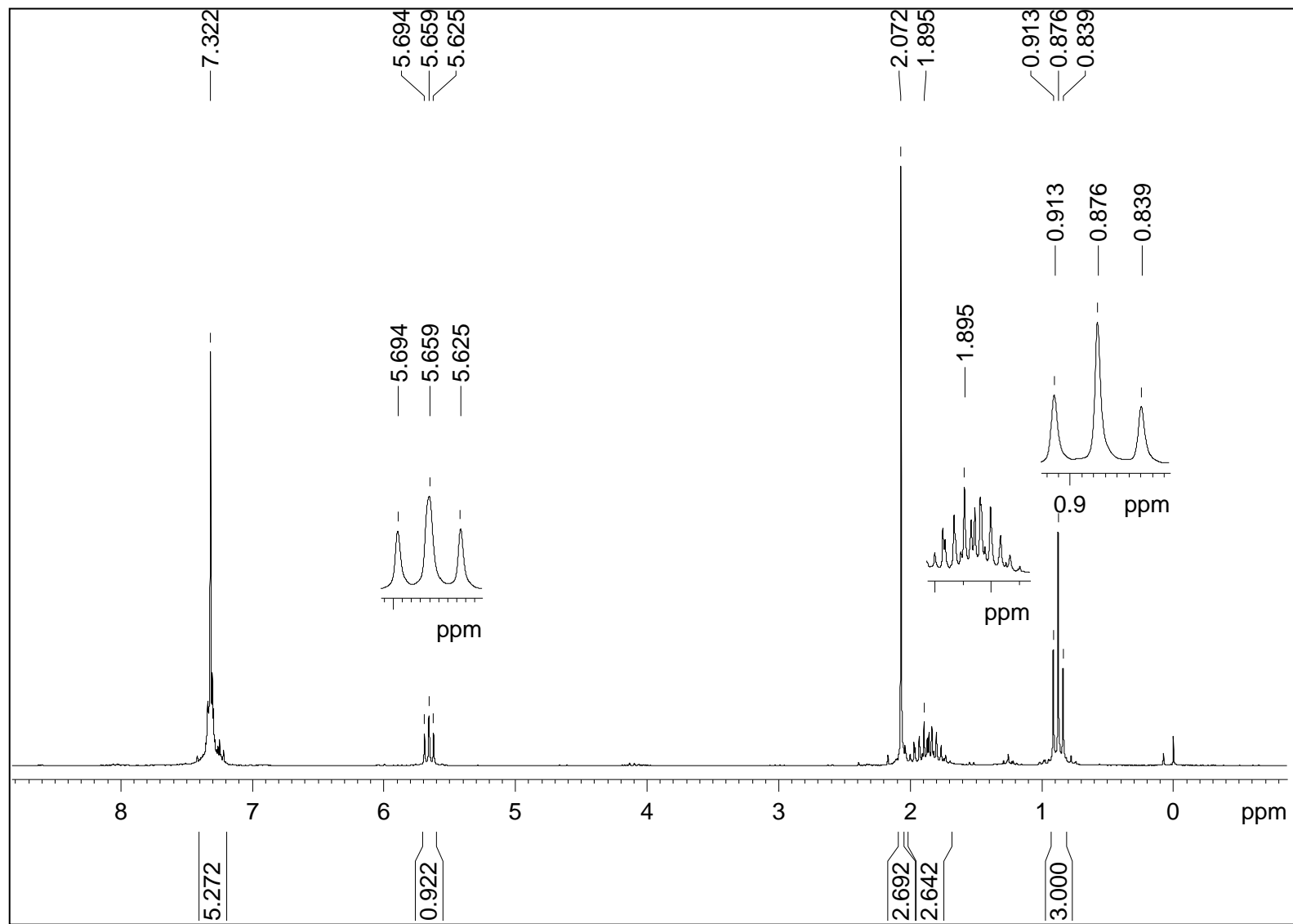
RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9,8; 21,2; 29,2; 126,5; 127,8; 128,3; 140,5; 170,4.



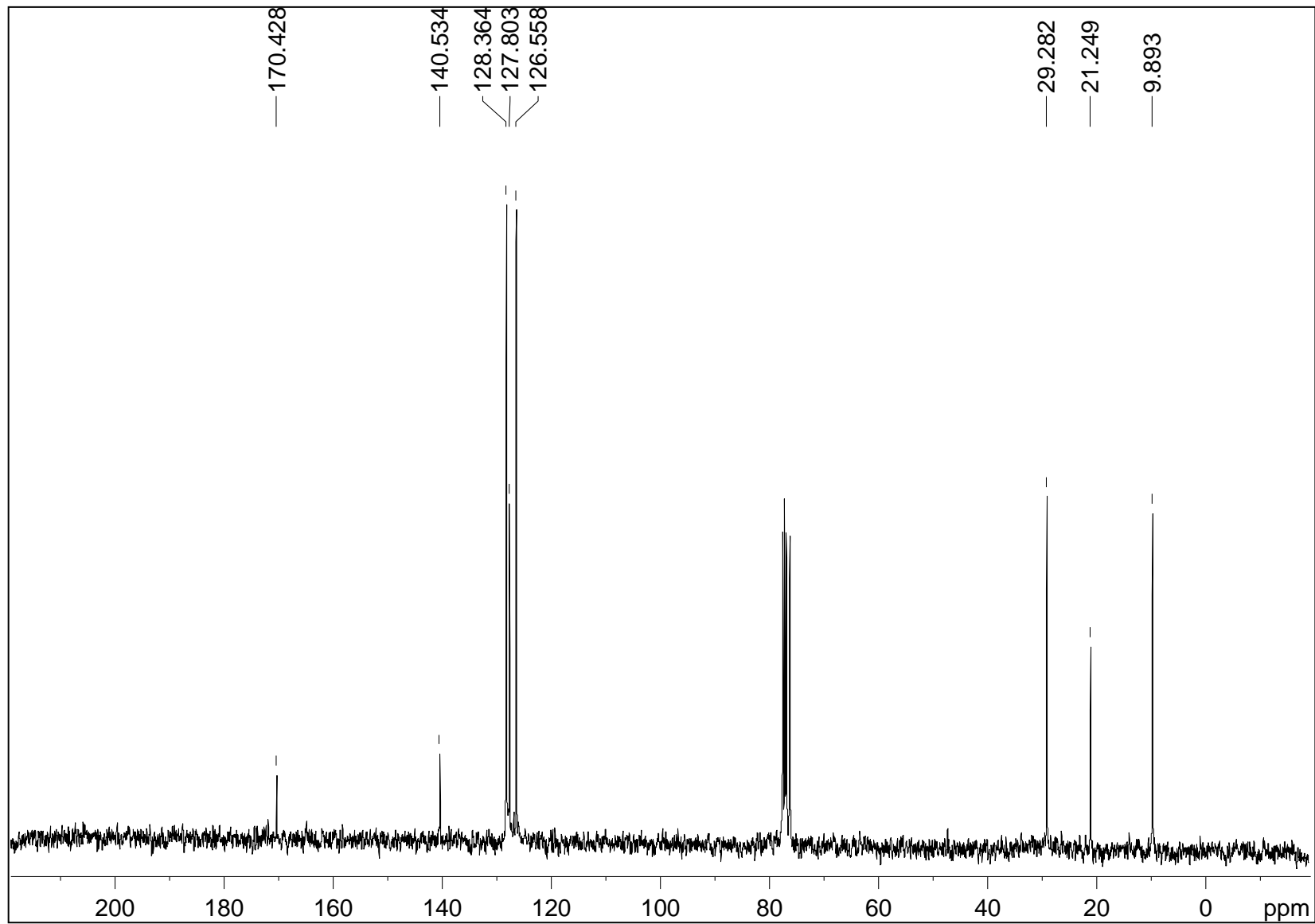
Espectro de MS do Acetato de 1-fenil-1-propila.



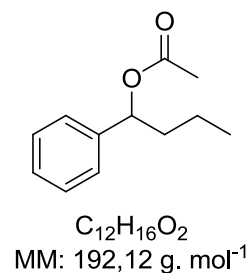
Espectro de FTIR do Acetato de 1-fenil-1-propila.



Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) do Acetato de 1-fenil-1-propila.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do Acetato de 1-fenil-1-propila.



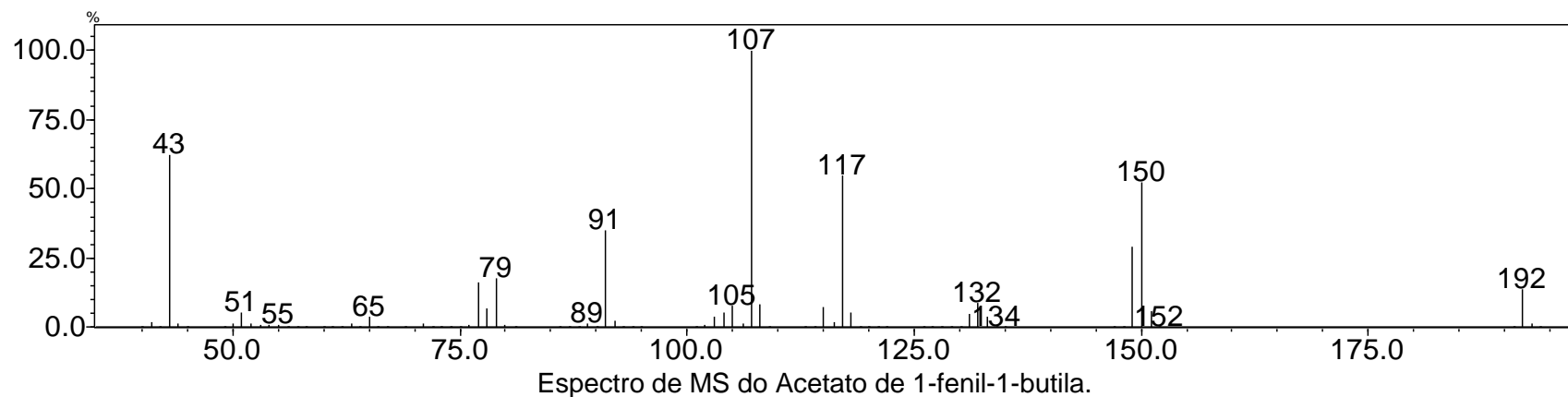
Acetato de 1-fenilbutila (**5a**) Rendimento: 60%.

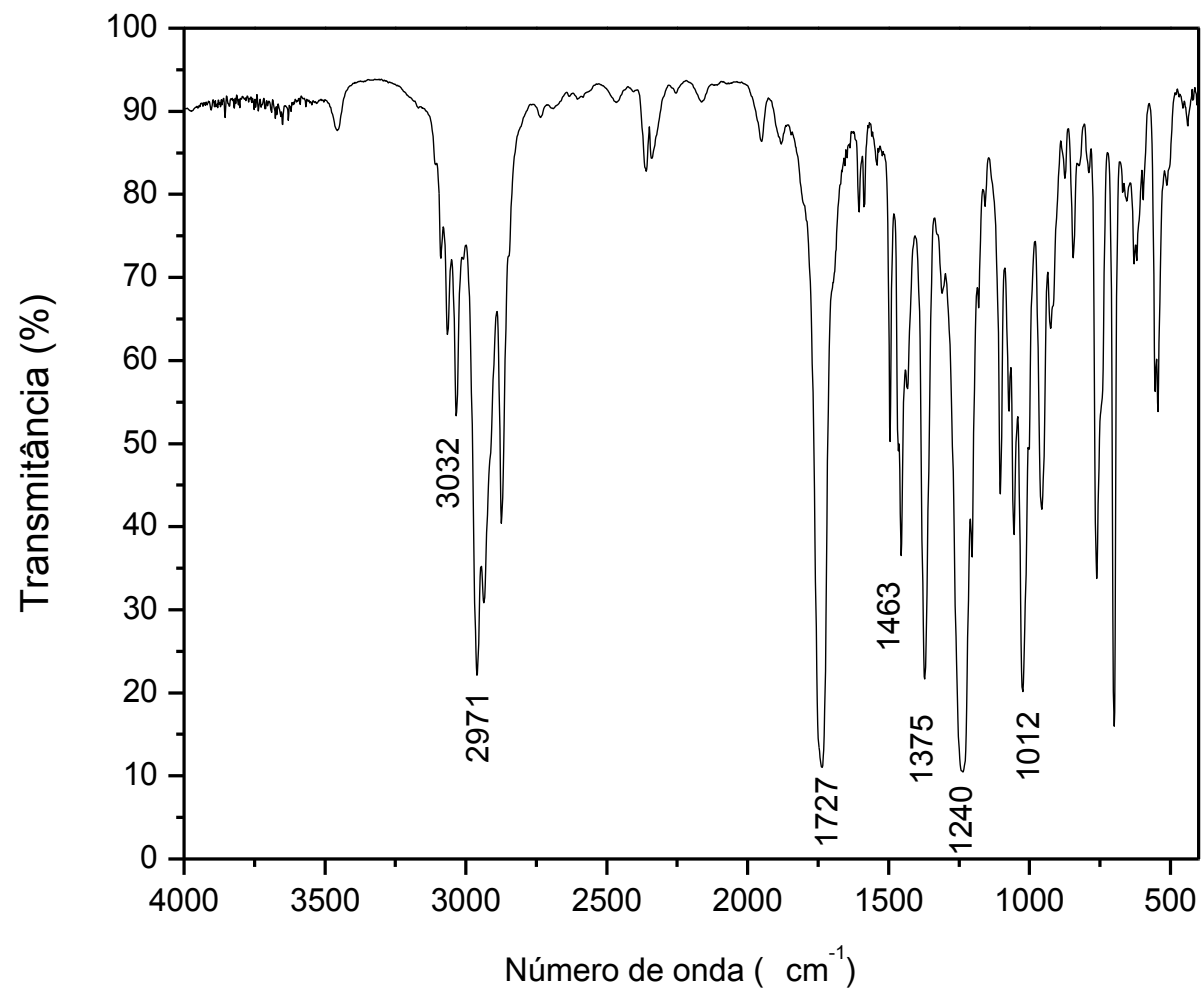
CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 192 (M^+ , 14%); 150 (52%); 132 (9%); 117 (54%); 107 (100%); 91 (35%); 79 (18%); 77 (16%); 43 (62%).

IV (cm^{-1}): 3032, 2971, 1727, 1463, 1375, 1240, 1012.

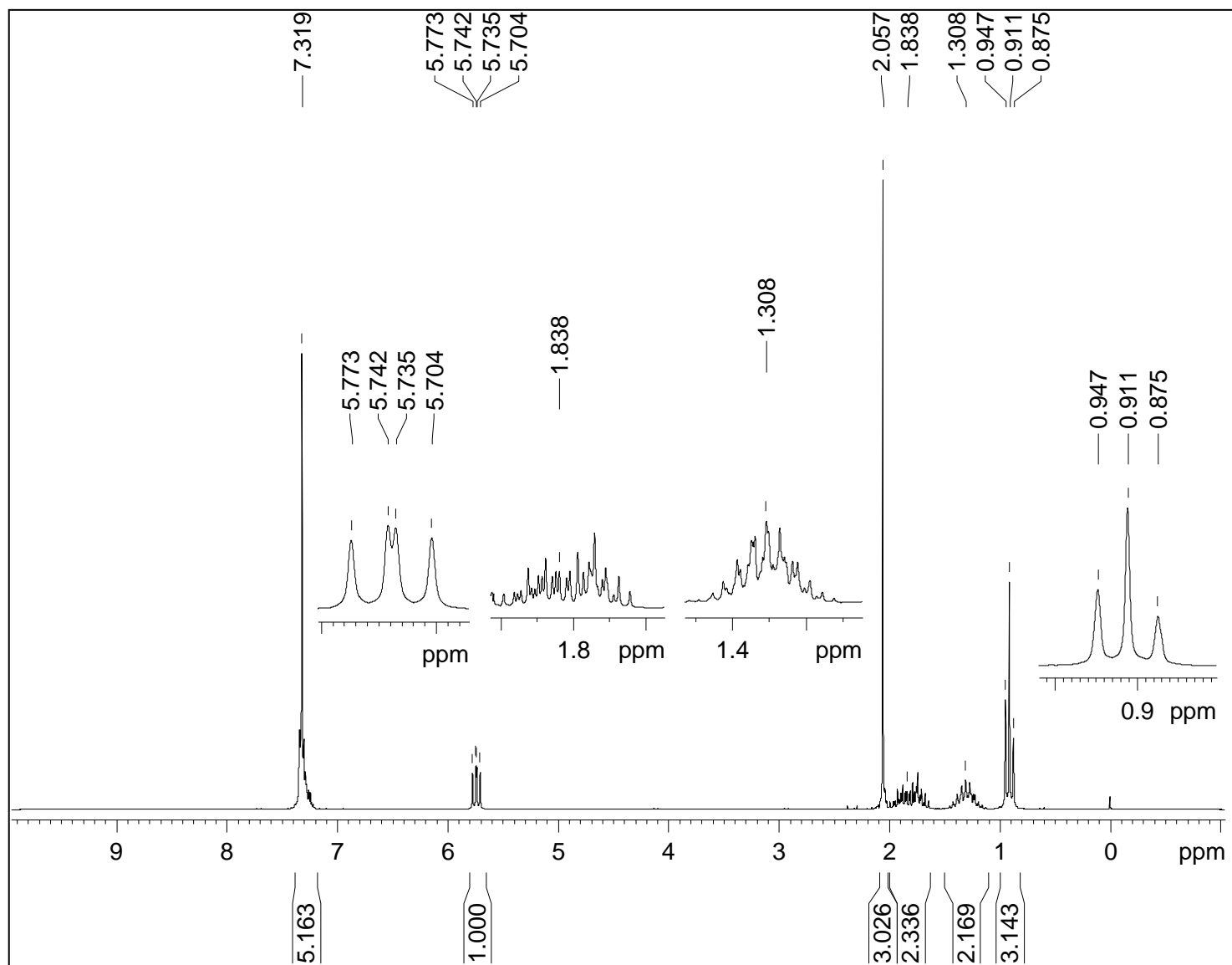
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 0,91 (t, J = 7,3 Hz, 3H); 1,30 (m, 2H); 1,80 (m, 2H); 2,05 (s, 3H); 5,73 (t; J = 7,0 Hz; 1H); 7,31 (m, 5H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 13,8; 18,8; 21,3; 38,4; 75,9; 126,5; 127,8; 140,8; 170,3.

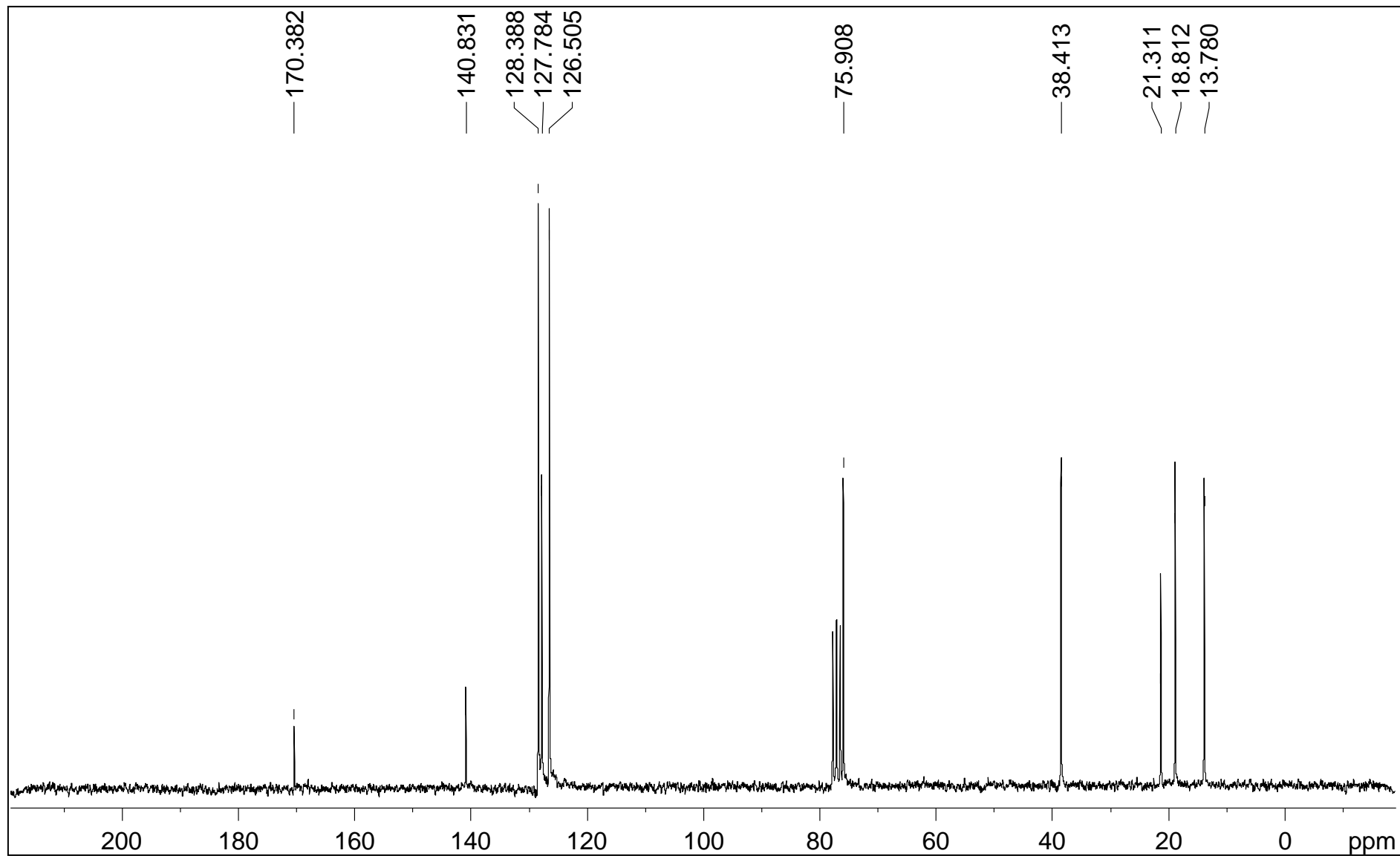




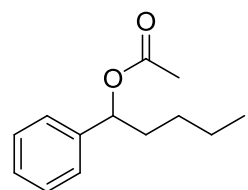
Espectro de FTIR do Acetato de 1-fenil-1-butila.



Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do Acetato de 1-fenil-1-butila.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do Acetato de 1-fenil-1-butila.



$C_{13}H_{18}O_2$
MM: 206,13 g. mol⁻¹

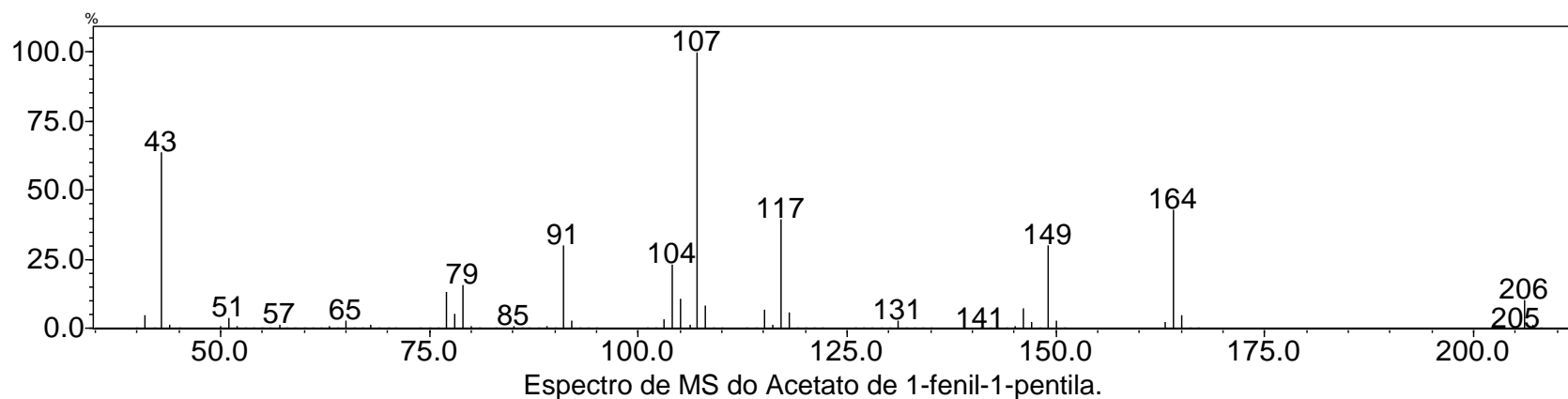
Acetato de 1-fenilpentila (**6a**) Rendimento: 70%.

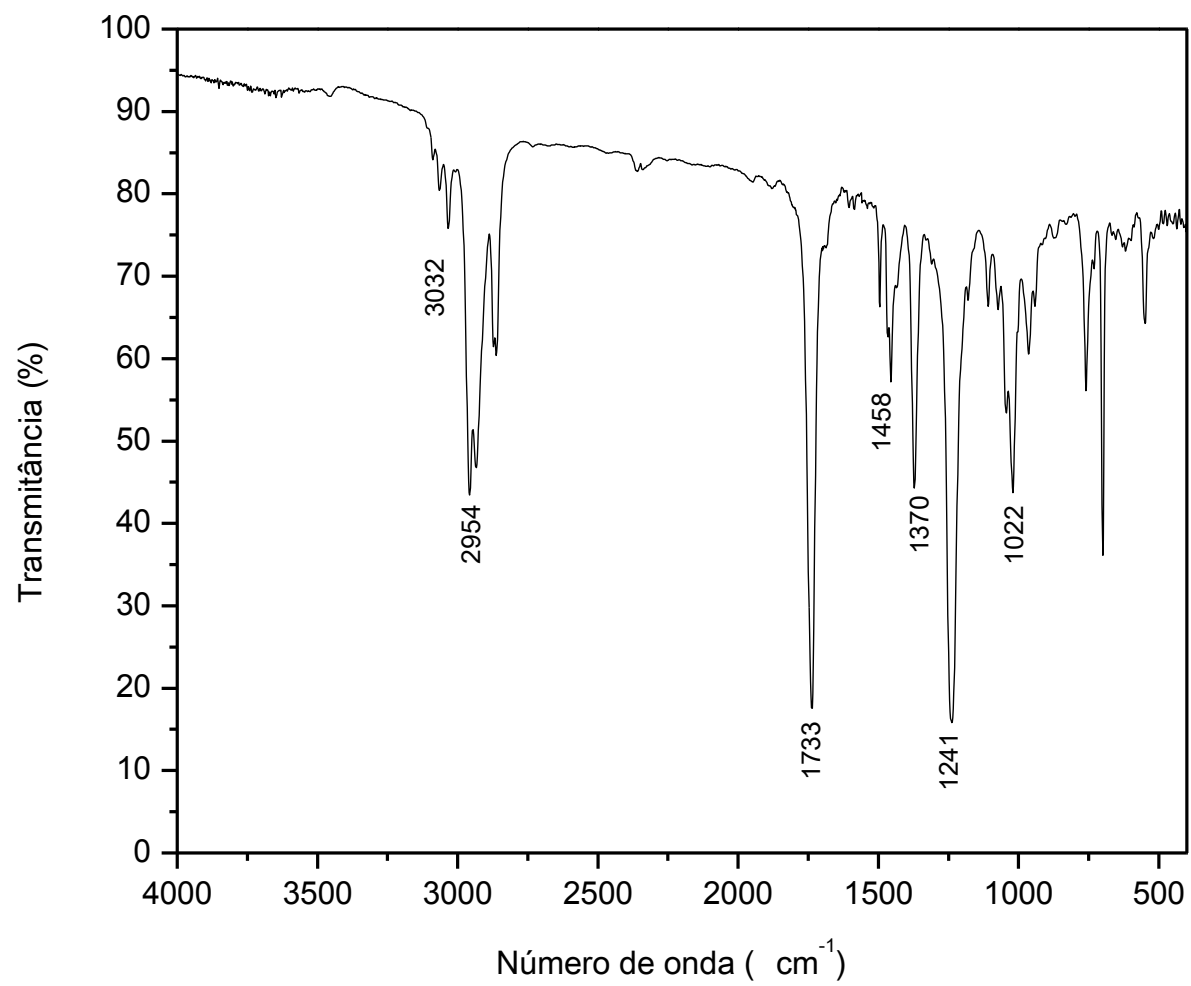
CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 206 (M^+ , 10%); 164 (43%); 149 (30%); 117 (39%); 107 (100%); 104 (23%); 91 (30%); 79 (16%); 77 (13%); 43 (64%).

IV (cm⁻¹): 3032, 2954, 1733, 1458, 1370, 1241, 1022.

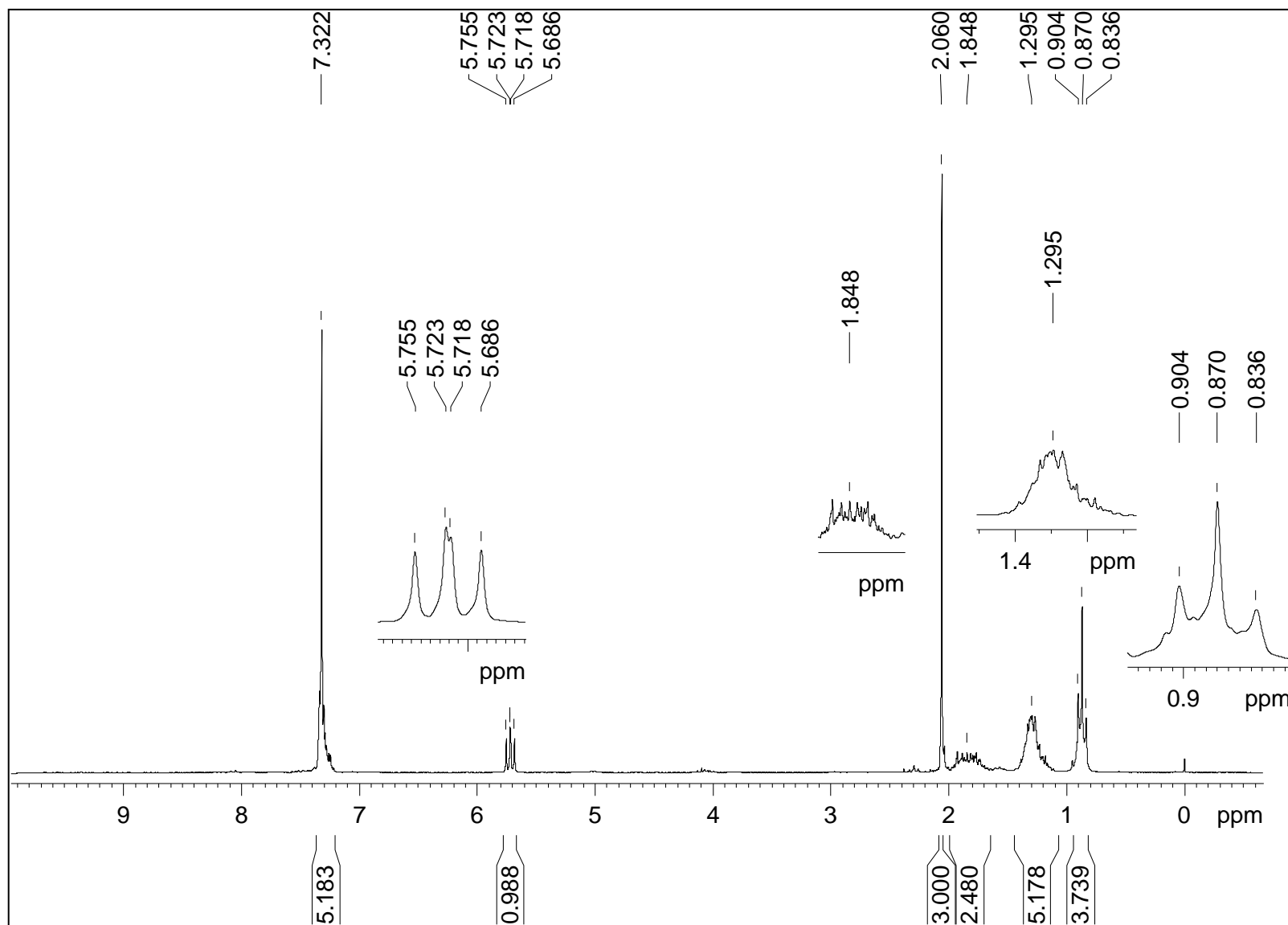
RMN de ¹H (200 MHz - CDCl₃), δ (ppm): 0,87 (t; J = 6,6 Hz; 3H); 1,29 (m, 4H); 1,84 (m, 2H); 2,06 (s, 3H); 5,72 (t; J = 6,9 Hz; 7,63 Hz, 1H); 7,32 (m, 5H).

RMN de ¹³C (50 MHz - CDCl₃), δ (ppm): 13,8; 21,3; 22,4; 27,6; 36,0; 76,1; 126,5; 127,7; 128,4; 140,8; 170,3.

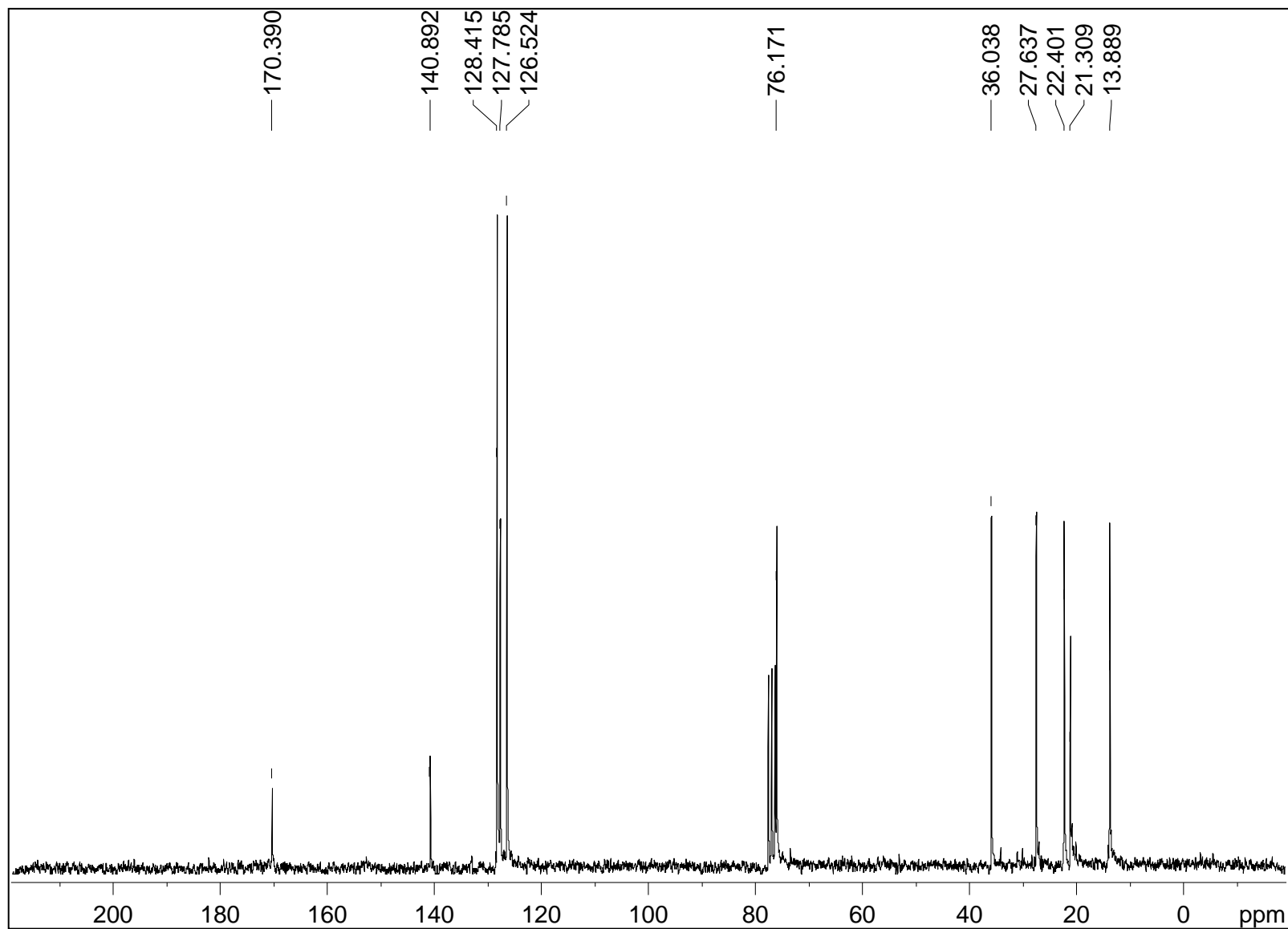




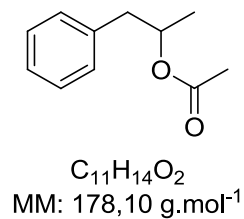
Espectro de FTIR do Acetato de 1-fenil-1-pentila.



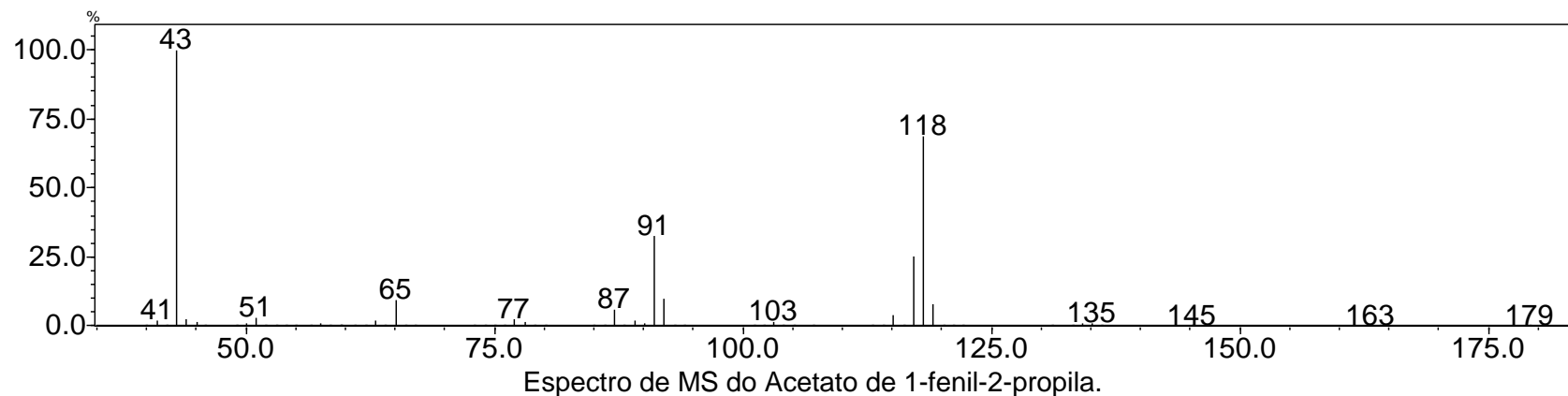
Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do Acetato de 1-fenil-1-pentila.

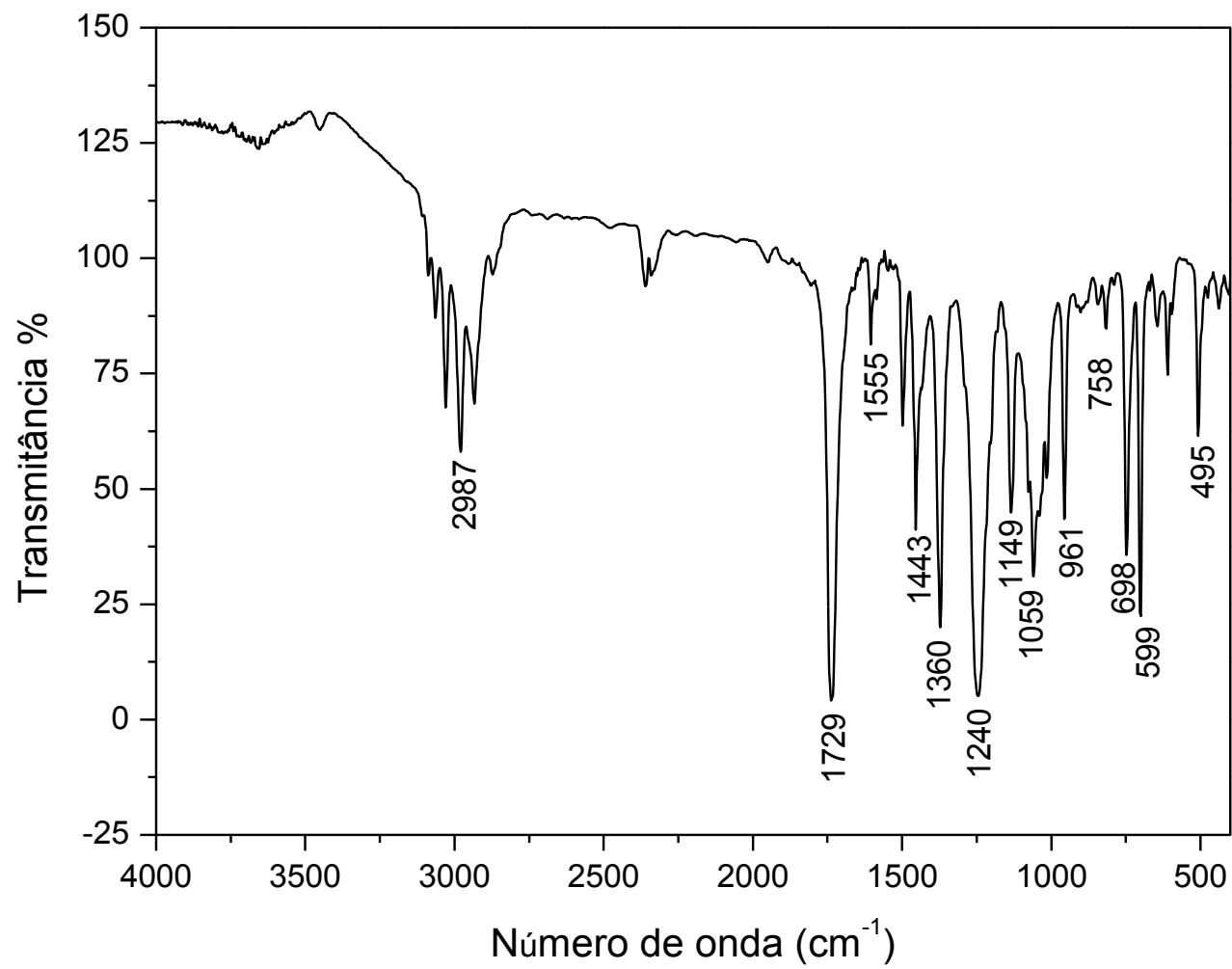


Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do Acetato de 1-fenil-1-pentila.

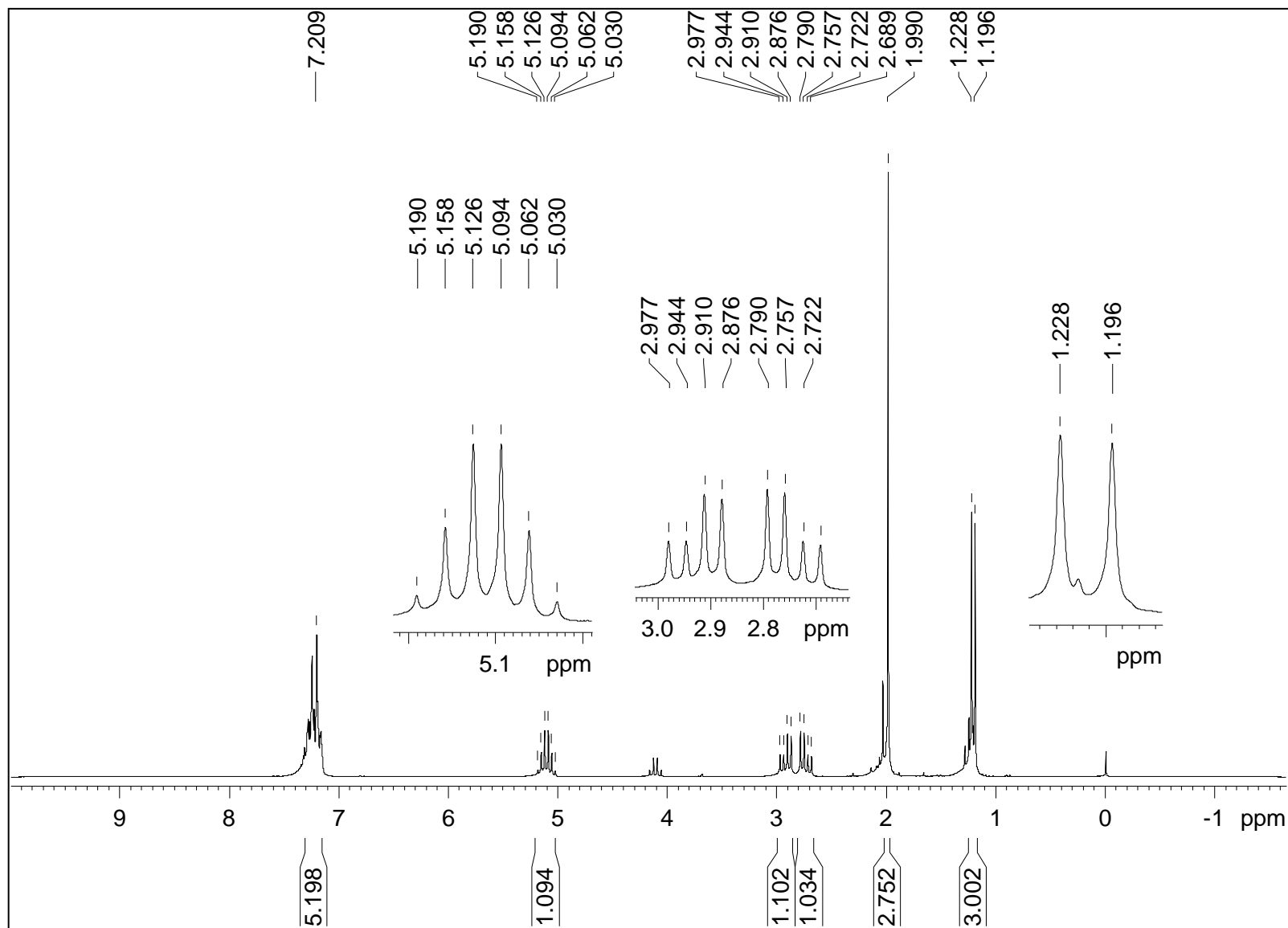


Acetato de 1-fenilprop-2-ila (**7a**) Rendimento: 80%.
 CG-EM (70 eV), m/z (intensidade relativa): 179,1 (M^+ , 0,01%); 118 (70%); 91 (33%); 43 (100%).
 IV (cm^{-1}): 2987, 1729, 1555, 1443, 1360, 1240, 1149, 1059, 961, 758, 698, 599, 495.
 RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1,21 (d, $J = 6,3$, 3H); 1,99 (s, 3H); 2,83 (dq, $J = 6,7$, 2H); 5,11 (sex, $J = 6, 2$, 1H); 7,20 (m, 5H).
 RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 19,4; 21,2; 42,2; 71,4; 126,4; 128,3; 129,3; 137,6; 170,5.

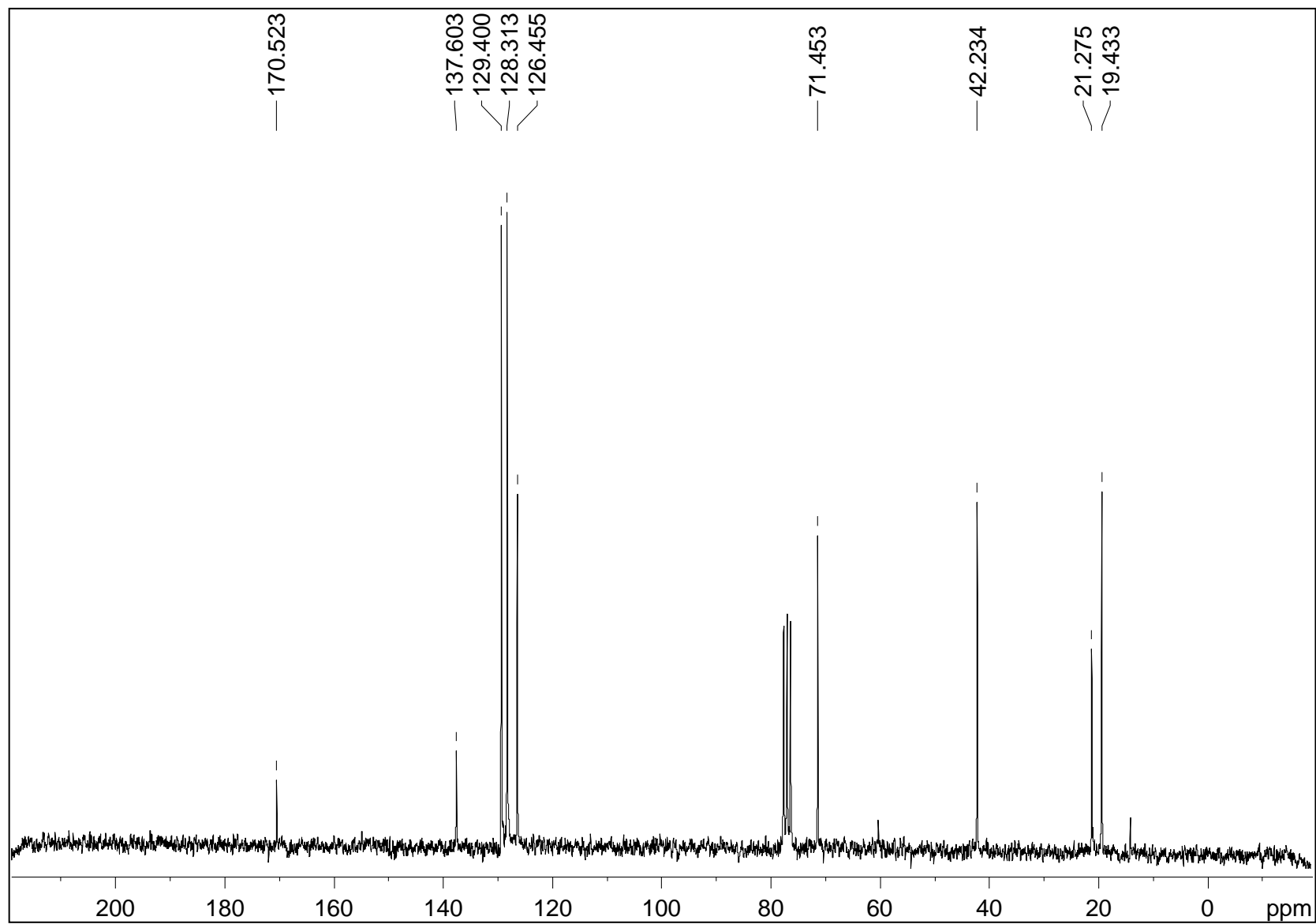




Espectro de FTIR do Acetato de 1-fenil-2-propila.



Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do Acetato de 1-fenil-2-propila.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do Acetato de 1-fenil-2-propila.